

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202192835 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.06.03

(22) Дата подачи заявки
2020.04.15

(51) Int. Cl. C12N 15/113 (2010.01)
C12N 15/11 (2006.01)
C12N 15/10 (2006.01)
A61K 31/712 (2006.01)

(54) СПОСОБЫ И КОМПОЗИЦИИ ДЛЯ РЕДАКТИРОВАНИЯ РНК

(31) PCT/CN2019/082713;
PCT/CN2019/129952
(32) 2019.04.15; 2019.12.30
(33) CN
(86) PCT/CN2020/084922
(87) WO 2020/211780 2020.10.22
(71) Заявитель:
ЭДИДЖЕН ИНК.; ПЕКИН
ЮНИВЕРСИТИ (CN)

(72) Изобретатель:
Юань Пэнфэй, Чжао Янься, Лю
Нэнинь, И Цзэсюань, Тан Ганбинь,
Вэй Вэньшэн, Цюй Лян, И Цзунь, Чжу
Шию, Ван Чуньхой, Цао Чжунчжэн,
Чжоу Чжо (CN)
(74) Представитель:
Харин А.В., Стойко Г.В., Галухина
Д.В., Буре Н.Н., Алексеев В.В. (RU)

(57) В настоящей заявке представлены способы редактирования РНК путем введения РНК, рекрутирующей дезаминазу, в клетку-хозяин для дезаминирования аденозина в целевой РНК. В настоящей заявке также представлены РНК, рекрутирующие дезаминазу, используемые в способах редактирования РНК, и композиции, содержащие их.

202192835
A1

202192835

A1

СПОСОБЫ И КОМПОЗИЦИИ ДЛЯ РЕДАКТИРОВАНИЯ РНК

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

[0001] По настоящей заявке испрашивается приоритет в соответствии с международной патентной заявкой № PCT/CN2019/082713, поданной 15 апреля 2019 г., и международной патентной заявкой № PCT/CN2019/129952, поданной 30 декабря 2019 г.

[0002] Вышеупомянутые заявки и все документы, на которые имеется ссылка в материалах данных заявок, или во время их рассмотрения ("приложенные противопоставленные документы"), и все документы, цитируемые или упомянутые в приложенных противопоставленных документах, и все документы, цитируемые или упомянутые в настоящей заявке ("документы, цитируемые в настоящей заявке"), и все документы, цитируемые или упомянутые в документах, цитируемых в настоящей заявке, вместе с любыми инструкциями производителя, описаниями, техническими характеристиками и описаниями продуктов для любых продуктов, упомянутых в настоящей заявке или в любом документе, включенном в настоящую заявку посредством ссылки, включены в настоящий документ посредством ссылки и могут применяться в практике изобретения. Более конкретно, все документы, на которые имеется ссылка в материалах заявки, включены посредством ссылки в той же степени, как если бы каждый отдельный документ был специально и индивидуально указан как включенный посредством ссылки.

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ В ТЕКСТОВОМ ФОРМАТЕ ASCII

[0003] Перечень последовательностей, связанный с настоящей заявкой, представлен в текстовом формате ASCII, и настоящим включен в описание посредством ссылки: машиночитаемый формат (CRF), содержащий перечень последовательностей (имя файла FD0020PCT-sequence list.txt, дата создания 13 апреля 2020 г., размер 133 КБ).

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

[0004] Настоящее изобретение относится к способам и композициям для редактирования РНК с применением сконструированной РНК, способной рекрутировать аденозиндезаминазу для дезаминирования одного или более аденозинов в целевой РНК.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[0005] Редактирование генома представляет собой мощный инструмент для биомедицинских исследований и разработки терапевтических средств от болезней. На сегодняшний день самой популярной технологией редактирования генома является система кластеризованных регулярных промежуточных коротких палиндромных повторов (CRISPR)-Cas, которая была разработана на основе адаптивной иммунной системы

бактерий и архей. CRISPR-Cas может точно нацеливаться и расщеплять геномную ДНК, создавая двухцепочечный разрыв ДНК (DSB). DSB можно восстанавливать с помощью путей нехомологичного соединения концов (NHEJ), что часто приводит к вставке или делеции (Indel), что в большинстве случаев инактивирует ген. В качестве альтернативы, путь гомологически-направленной репарации (HDR) может восстанавливать DSB с применением гомологичных матриц дцДНК (двухцепочечная ДНК) или оцДНК (одноцепочечная ДНК) и, таким образом, обеспечивать точное редактирование генома.

[0006] Недавно, с применением преимуществ белков дезаминаз, таких как аденозиндезаминаза, действующая на РНК (ADAR), были разработаны новые инструменты для редактирования РНК. В клетках млекопитающих существует три типа белков ADAR: ADAR1 (две изоформы, p110 и p150), ADAR2 и ADAR3 (каталитически неактивные). Каталитическим субстратом белка ADAR является двухцепочечная РНК. ADAR удаляет группу $-NH_2$ из аденозина (A), превращая A в инозин (I), который распознается как гуанозин (G) и соединяется с цитидином (C) во время последующих клеточных процессов транскрипции и трансляции. Исследователи слили пептид λN с доменом дезаминазы ADAR1 или ADAR2 человека, чтобы сконструировать систему λN -ADARDD, которая может быть направлена на связывание определенных целевых РНК с помощью слитой РНК, состоящей из структуры "петля-на-стебле" BoxB и антисмысловой РНК. Данный способ преобразует целевой A в I, путем ввода ошибки спаривания A-C в целевое основание A, что приводит к редактированию основания РНК A в G. Другие способы редактирования РНК включают слияние антисмысловой РНК с мотивом R/G (каркас РНК, рекрутирующего ADAR) для редактирования целевой РНК путем сверхэкспрессии белка ADAR1 или ADAR2 в клетках млекопитающих, а также применение dCas13-ADAR для точного нацеливания и редактирования РНК. В заявке на патент PCT/EP2017/071912 раскрыт способ редактирования РНК, не требующий экзогенных белков или рекрутирующего домена на нуклеиновых кислотах. Синтезированную РНК, содержащую комплементарную последовательность целевой РНК, применяли для индукции редактирования основания A в G. РНК, применяемая в способе, короткая (менее 54 нуклеотидов(нт, nt)) и должна быть специально модифицирована для повышения эффективности редактирования.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0007] Редактирование нуклеиновой кислоты несет в себе огромный потенциал для биологических исследований и разработки терапевтических средств. Большинство современных инструментов для редактирования ДНК или РНК основаны на введении экзогенных белков в живые организмы, что связано с потенциальными рисками или техническими препятствиями из-за возможной аберрантной эффекторной активности,

ограничений доставки и иммуногенности. Некоторые другие инструменты требуют сложных химических модификаций, но все же приводят к низкой эффективности редактирования. В некоторых аспектах настоящее изобретение относится к программируемому подходу, применяющему короткую РНК для применения дезаминазы для целевого редактирования РНК, в некоторых вариантах осуществления дезаминаза представляет собой белок ADAR (аденозиндезаминаза, действующая на РНК), в некоторых вариантах осуществления ADAR представляет собой эндогенный белок ADAR. В некоторых аспектах настоящее изобретение относится к сконструированной РНК, частично комплементарной целевому транскрипту для рекрутирования ADAR1 или ADAR2 для преобразования аденозина в инозин в определенном сайте целевой РНК. Описанные в настоящем документе способы в совокупности называются "LEAPER" (применение эндогенного ADAR для программируемого редактирования РНК), а РНК, рекрутирующие ADAR, взаимозаменяемо называются "dРНК" (dRNA) или "arРНК".

[0008] В одном аспекте настоящее изобретение относится к способу редактирования целевой РНК в клетке-хозяин, включающему введение РНК, рекрутирующей дезаминазу (dРНК), или конструкции, кодирующей РНК, рекрутирующей дезаминазу, в клетку-хозяин, где dРНК содержит комплементарную последовательность РНК, которая гибридизуется с целевой РНК, и где dРНК способна рекрутировать дезаминазу для дезаминирования целевого нуклеотида, в некоторых вариантах осуществления аденозиндезаминаза действует на РНК (ADAR) для дезаминирования целевого аденозина (А) в целевой РНК. В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин представляет собой эукариотическую клетку. В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин представляет собой клетку млекопитающего. В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин представляет собой клетку человека. В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин представляет собой клетку мыши. В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин представляет собой прокариотическую клетку. В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин представляет собой первичную клетку. В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин представляет собой Т-клетку.

[0009] В некоторых вариантах осуществления ADAR присутствует в клетке-хозяине естественно или эндогенно, например, естественно или эндогенно присутствует в эукариотической клетке. В некоторых вариантах осуществления ADAR эндогенно экспрессируется клеткой-хозяин. В некоторых вариантах осуществления ADAR является экзогенным по отношению к клетке-хозяин. В некоторых вариантах осуществления ADAR кодируется нуклеиновой кислотой (например, ДНК или РНК). В некоторых вариантах осуществления способ включает введение ADAR или конструкции, кодирующей ADAR, в

клетку-хозяин. В некоторых вариантах осуществления способ не включает введение какого-либо белка в клетку-хозяин. В некоторых вариантах осуществления ADAR представляет собой ADAR1 и/или ADAR2. В некоторых вариантах осуществления ADAR представляет собой один или более ADAR, выбранных из группы, состоящей из hADAR1, hADAR2, мышиного ADAR1 и мышиного ADAR2.

[0010] В некоторых вариантах осуществления dPHK не распознается Cas (CRISPR-ассоциированный белок). В некоторых вариантах осуществления dPHK не содержит crPHK, tracrPHK или gPHK, применяемые в системе CRISPR/Cas. В некоторых вариантах осуществления способ не включает введение белка Cas или слитого белка Cas в клетку-хозяин.

[0011] В некоторых вариантах осуществления дезаминирование целевого А в целевой РНК приводит к миссенс-мутации, раннему стоп-кодону, абберрантному сплайсингу или альтернативному сплайсингу в целевой РНК. В некоторых вариантах осуществления целевая РНК кодирует белок, и дезаминирование целевого А в целевой РНК приводит к точечной мутации, усечению, удлинению и/или неправильной укладке белка. В некоторых вариантах осуществления дезаминирование целевого А в целевой РНК приводит к обращению миссенс-мутации, раннего стоп-кодона, абберрантного сплайсинга или альтернативного сплайсинга в целевой РНК. В некоторых вариантах осуществления, где целевая РНК кодирует усеченный, удлинённый, мутированный или неправильно уложенный белок, дезаминирование целевого А в целевой РНК приводит к образованию функционального, полноразмерного, правильно уложенного и/или дикого типа белка посредством обращения миссенс-мутации, раннего стоп-кодона, абберрантного сплайсинга или альтернативного сплайсинга в целевой РНК. В некоторых вариантах осуществления целевая РНК представляет собой регуляторную РНК, и дезаминирование целевого А приводит к изменению экспрессии находящейся ниже молекулы, регулируемой целевой РНК. В некоторых вариантах осуществления способ предназначен для применения эндогенной аденозиндезаминазы для редактирования целевой РНК для создания точечной мутации и/или неправильной укладки белка, кодируемого целевой РНК, и/или создания раннего стоп-кодона, абберрантного сайта сплайсинга, и/или альтернативного сайта сплайсинга в целевой РНК.

[0012] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способу редактирования множества целевых РНК в клетках-хозяевах, где способ включает введение множества dPHK или конструкций, кодирующих множество dPHK, в клетки-хозяин, где каждая из множества РНК, рекрутирующих дезаминазу, содержат комплементарную последовательность РНК, которая гибридизуется с соответствующей

целевой РНК во множестве целевых РНК, и где каждая dРНК способна рекрутировать аденозиндезаминазу, действующую на РНК (ADAR), для дезаминирования целевого аденозина (A) в соответствующей целевой РНК.

[0013] В некоторых вариантах осуществления обеспечена отредактированная РНК или клетка-хозяин, имеющая отредактированную РНК, полученную любым из способов редактирования РНК, как описано выше.

[0014] В одном аспекте настоящее изобретение относится к способу лечения или профилактики заболевания или состояния у индивидуума, включающему редактирование целевой РНК, ассоциированной с заболеванием или состоянием в клетке индивидуума, в соответствии с любым из способов редактирования РНК, как описано выше. В некоторых вариантах осуществления способ включает редактирование целевой РНК в клетке *ex vivo*. В некоторых вариантах осуществления способ включает введение отредактированной клетки индивидууму. В некоторых вариантах осуществления способ включает введение индивидууму эффективного количества dРНК или конструкции, кодирующей или содержащей dРНК. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает введение в клетку ADAR или конструкции (например, вирусного вектора), кодирующей ADAR. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает введение индивидууму ADAR или конструкции (например, вирусного вектора), кодирующей ADAR. В некоторых вариантах осуществления заболевание или состояние представляет собой наследственное генетическое заболевание. В некоторых вариантах осуществления заболевание или состояние связано с одной или более приобретенными генетическими мутациями, например, с устойчивостью к лекарственному средству.

[0015] В одном аспекте настоящее изобретение относится к dРНК, содержащей комплементарную последовательность РНК, которая гибридизуется с целевой РНК, для дезаминирования целевого аденозина в целевой РНК путем рекрутирования дезаминазы, в некоторых вариантах осуществления аденозиндезаминазы, действующей на РНК (ADAR), чтобы дезаминировать целевой аденозин в целевой РНК.

[0016] В некоторых вариантах осуществления в соответствии с любым из способов или dРНК, описанных в настоящем документе, dРНК содержит последовательность РНК, содержащую цитидин (C), аденозин (A) или уридин (U), прямо противоположный целевому аденозину, подлежащему редактированию в целевой РНК при связывании с целевой РНК. Цитидин (C), аденозин (A) и уридин (U), прямо противоположные целевому аденозину, вместе называются "нацеливающим нуклеотидом" или по отдельности "нацеливающим C", "нацеливающим A" и "нацеливающим U". В некоторых вариантах осуществления последовательность РНК дополнительно содержит один или более гуанозинов, каждый

прямо противоположен нецелевому аденозину(ам) в целевой РНК. В некоторых вариантах осуществления 5' ближайший сосед целевого А в последовательности целевой РНК представляет собой нуклеотид, выбранный из U, C, A и G, предпочтительно $U > C \approx A > G$, и 3' ближайший сосед целевого А в последовательности целевой РНК представляет собой нуклеотид, выбранный из G, C, A и U, предпочтительно $G > C > A \approx U$. В некоторых вариантах осуществления целевой А находится в мотиве из трех оснований, выбранном из группы, состоящей из UAG, UAC, UAA, UAU, CAG, CAC, CAA, CAU, AAG, AAC, AAA, AAU, GAG, GAC, GAA и GAU, в целевой РНК. В некоторых вариантах осуществления, где мотив из трех оснований представляет собой UAG, dРНК содержит А, прямо противоположный U в мотиве из трех оснований, C, прямо противоположный целевому А, и C, G или U, прямо противоположный G в мотиве из трех оснований. В некоторых вариантах осуществления, где мотив из трех оснований представляет собой UAG в целевой РНК, dРНК содержит ACC, ACG или ACU, противоположный UAG целевой РНК.

[0017] В некоторых вариантах осуществления в соответствии с любым из способов или dРНК, описанных в настоящем документе, РНК, рекрутирующая дезаминазу, содержит более 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75 или 80 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения РНК, рекрутирующая дезаминазу, имеет длину от 40 до 260, от 45 до 250, от 50 до 240, от 60 до 230, от 65 до 220, от 70 до 210, от 70 до 200, от 70 до 190, от 70 до 180, от 70 до 170, от 70 до 160, от 70 до 150, от 70 до 140, от 70 до 130, от 70 до 120, от 70 до 110, от 70 до 100, от 70 до 90, от 70 до 80, от 75 до 200, от 80 до 190, от 85 до 180, от 90 до 170, 95 до 160, от 100 до 150 или от 105 до 140 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления dРНК имеет длину примерно от 60 до 200 (например, примерно от 60 до 150, от 65 до 140, от 68 до 130 или от 70 до 120) нуклеотидов.

[0018] В некоторых вариантах осуществления в соответствии с любым из способов или dРНК, описанных в данном документе, описанная в настоящем документе dРНК может быть охарактеризована как содержащая от 5'-конца до 3'-конца: 5'-участок, ошибка спаривания цитидина, прямо противоположного целевому А в целевой РНК, и 3'-участок. В некоторых вариантах осуществления 3'-участок не короче примерно 7 нт (например, не короче 8 нт, не короче 9 нт и не короче 10 нт) нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления 3'-участок имеет длину примерно от 7 до 25 нт нуклеотидов (например, примерно от 8 до 25 нт, от 9 до 25 нт, от 10 до 25 нт, от 11 до 25 нт, от 12 до 25 нт, от 13 до 25 нт, от 14 до 25 нт, от 15 до 25 нт, от 16 до 25 нт, от 17 до 25 нт, от 18 до 25 нт, от 19 до 25 нт, от 20 до 25 нт, от 21 до 25 нт, от 22 до 25 нт, от 23 до 25 нт, от 24 до 25 нт и, например, длину от 10 до 15 нт или от 21 до 25 нт нуклеотидов). В некоторых вариантах осуществления 5'-участок не короче примерно 25 (например, не короче примерно 30, не

короче примерно 35 нт, не короче примерно 40 нт и не короче примерно 45 нт) нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления 5'-участок имеет длину примерно от 25 до 85 нт нуклеотидов (например, длину примерно от 25 до 80 нт, от 25 до 75 нт, от 25 до 70 нт, от 25 до 65 нт, от 25 до 60 нт, от 30 до 55 нт, от 40 до 55 нт или от 45 до 55 нт нуклеотидов). В некоторых вариантах осуществления 5'-участок имеет длину примерно от 25 до 85 нт нуклеотидов (например, длину примерно от 25 до 80 нт, от 25 до 75 нт, от 25 до 70 нт, от 25 до 65 нт, от 25 до 60 нт, от 30 до 55 нт, от 40 до 55 нт или от 45 до 55 нт нуклеотидов), а 3'-участок имеет длину примерно от 7 до 25 нт нуклеотидов (например, длину примерно от 10 до 15 нт или от 21 до 25 нт нуклеотидов). В некоторых вариантах осуществления 5'-участок длиннее 3'-участка. В некоторых вариантах осуществления 5'-участок имеет длину примерно 55 нуклеотидов, а 3'-участок имеет длину примерно 15 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления положение ошибки спаривания цитидина в dРНК соответствует любой из dРНК, описанных в примерах в настоящем документе, и dРНК может быть представлена, например, в формате Xнт-с-Yнт, где X представляет собой длину 5'-участка, и Y представляет собой длину 3'-участка: 55нт-с-35нт, 55нт-с-25нт, 55нт-с-24нт, 55нт-с-23нт, 55нт-с-22нт, 55нт-с-21нт, 55нт-с-20нт, 55нт-с-19нт, 55нт-с-18нт, 55нт-с-17нт, 55нт-с-16нт, 55нт-с-15нт, 55нт-с-14нт, 55нт-с-13нт, 55нт-с-12нт, 55нт-с-11нт, 55нт-с-10нт, 55нт-с-9нт, 55нт-с-8нт, 55нт-с-7нт, 55нт-п-20нт, 50нт-п-20нт, 45нт-п-20нт, 55нт-п-15нт, 50нт-п-15нт, 45нт-с-45нт, 45нт-с-55нт, 54нт-с-12нт, 53нт-с-13нт, 52нт-с-14нт, 51нт-с-15нт, 50нт-с-16нт, 49нт-с-17нт, 48нт-с-18нт, 47нт-с-19нт, 46нт-с-20нт, 45нт-с-21нт, 44нт-с-22нт, 43нт-с-23нт, 54нт-с-15нт, 53нт-с-16нт, 52нт-с-17нт, 51нт-с-18нт, 50нт-с-19нт, 49нт-с-20нт, 48нт-с-21нт, 47нт-с-22нт, 46нт-с-23нт, 54нт-с-17нт, 53нт-п-18нт, 52нт-п-19нт, 51нт-п-20нт, 50нт-п-21нт, 49нт-п-22нт и 48нт-с-23.

[0019] В некоторых вариантах осуществления целевая РНК представляет собой РНК, выбранную из группы, состоящей из предшественника мРНК, матричной РНК, рибосомной РНК, транспортной РНК, длинной некодирующей РНК и малой РНК (например, микроРНК).

[0020] В некоторых вариантах осуществления согласно любому из способов или dРНК, описанных в настоящем документе, dРНК представляет собой одноцепочечную РНК. В некоторых вариантах осуществления комплементарная последовательность РНК является одноцепочечной и где dРНК дополнительно содержит одну или более двухцепочечных областей.

[0021] В некоторых вариантах осуществления dРНК содержит одну или более модификаций, таких как 2'-О-метилирование и/или фосфоротиоат. В некоторых вариантах осуществления dРНК имеет длину примерно от 60 до 200 нуклеотидов и включает одну или

более модификаций (таких как 2'-О-метилование и/или фосфоротиоат). В некоторых вариантах dРНК содержит 2'-О-метилование в первых и последних 3 нуклеотидах и/или фосфоротиоат в первых и последних 3 межнуклеотидных связях. В некоторых вариантах осуществления dРНК содержит 2'-О-метилование в первых и последних 3 нуклеотидах, фосфоротиоат в первых и последних 3 межнуклеотидных связях и 2'-О-метилование в одном или более уридинах, например, во всех уридинах. В некоторых вариантах осуществления dРНК содержит 2'-О-метилование в первых и последних 3 нуклеотидах, фосфоротиоат в первых и последних 3 межнуклеотидных связях, 2'-О-метилование в одном, или более, или всех уридинах и модификацию в нуклеотиде, противоположном целевому аденозину, и/или одном или двух нуклеотидах, ближайших к нуклеотиду, противоположному целевому аденозину. В некоторых вариантах осуществления модификация в нуклеотиде, противоположном целевому аденозину, и/или одном или двух нуклеотидах, ближайших к нуклеотиду, противоположному целевому аденозину, представляет собой 2'-О-метилование. В некоторых вариантах осуществления модификация в нуклеотиде, противоположном целевому аденозину, и/или одном или двух нуклеотидах, ближайших к нуклеотиду, противоположному целевому аденозину, представляет собой фосфоротионированную связь, такую как 3'-фосфоротионированная связь. В некоторых вариантах осуществления dРНК содержит 2'-О-метилование в первых и последних 3 нуклеотидах, фосфоротиоат в первых и последних 3 межнуклеотидных связях, 2'-О-метилование во всех уридинах и 2'-О-метилование в нуклеотиде, прилегающем к 3'-концу или 5'-концу нуклеотида, противоположного целевому аденозину. В некоторых вариантах осуществления dРНК содержит 2'-О-метилование в первых и последних 3 нуклеотидах, фосфоротиоат в первых и последних 3 межнуклеотидных связях, 2'-О-метилование во всех уридинах и 3'-фосфоротиоат в нуклеотиде, противоположном целевому аденозину, и/или его 5' и/или 3' ближайших нуклеотидах. В некоторых вариантах осуществления dРНК содержит 2'-О-метилование в первых и последних 5 нуклеотидах и фосфоротиоат в первых и последних 5 межнуклеотидных связях.

[0022] В некоторых вариантах осуществления согласно любому из описанных в настоящем документе способов эффективность редактирования целевой РНК составляет по меньшей мере примерно 30 %, например, по меньшей мере примерно 32 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 % или выше.

[0023] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к конструкции (например, вирусный вектор или плазида), кодирующей любую из dРНК, описанных выше. В некоторых вариантах осуществления конструкция содержит промотор, функционально связанный с последовательностью, кодирующей dРНК. В некоторых

вариантах осуществления конструкция представляет собой конструкцию ДНК.

[0024] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к библиотеке, содержащей множество dPHK в соответствии с любой из dPHK, описанных выше, или множество конструкций в соответствии с любой из конструкций, описанных выше.

[0025] Также настоящее изобретение относится к композициям, клеткам-хозяин, наборам и промышленным изделиям, содержащим любую из dPHK, описанных в настоящем документе, любую из конструкций, описанных в настоящем документе, или любую из библиотек, описанных в настоящем документе.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[0026] На фиг. 1A-1H показано редактирование РНК с помощью одной dPHK с применением эндогенного белка ADAR1. На фиг. 1A и 1B схематично показано редактирование РНК с помощью эндогенного белка ADAR1. На фиг. 1C показано редактирование репортерной мРНК с помощью dPHK с применением эндогенного белка ADAR1. На фиг. 1D показан статистический анализ результатов на фиг. 1B. На фиг. 1E показан нокаут ADAR1 и результаты восстановления ADAR1(p110), ADAR1(p150) и ADAR2. На фиг. 1F показан статистический анализ результатов на фиг. 1D. На фиг. 1G показано влияние избыточной экспрессии ADAR1(p110), ADAR1(p150) или ADAR2 на редактирование РНК, опосредованное dPHK, в клетках 293T-WT. На фиг. 1H показано, что результаты глубокого секвенирования (т.е. секвенирования следующего поколения, NGS) подтвердили редактирование А в G в целевом сайте.

[0027] На фиг. 2A-2H показана оптимизация dPHK. На фиг. 2A схематично показаны четыре типа основания (A, U, C и G), противоположные целевому аденозину. На фиг. 2B показано влияние противоположных к целевому аденозину оснований на эффективность редактирования РНК с помощью dPHK. На фиг. 2C схематично представлена dPHK с одним, двумя или тремя основаниями, ошибочно спаренными с целевым сайтом UAG. На фиг. 2D показано влияние одного, двух или трех оснований, ошибочно спаренных с целевым сайтом UAG, на редактирование репортерной РНК с помощью dPHK. dPHK предпочитительно имеет ошибку спаривания А-С по целевому аденозину. На фиг. 2E схематически показана dPHK с вариантной длиной. На фиг. 2F показано влияние длины dPHK на эффективность редактирования РНК на основе двойственной флуоресценции репортера-2. На фиг. 2G показано схематичное изображение различных положений ошибки спаривания А-С. На фиг. 2H показано влияние положения ошибки спаривания А-С на эффективность редактирования РНК.

[0028] На фиг. 3A-3B показана гибкость редактирования для редактирования

эндогенной РНК с помощью иллюстративного способа редактирования РНК по настоящему изобретению. На фиг. 3А показана процентная количественная оценка эффективности редактирования эндогенной РНК для всех 16 различных мотивов из трех оснований. На фиг. 3В показана тепловая карта предпочтений 5' и 3' оснований при редактировании эндогенной РНК для 16 различных мотивов из трех оснований.

[0029] На фиг. 4А-4Н показано редактирование мРНК эндогенных генов с помощью dРНК в клетках 293Т. На фиг. 4А показано схематическое изображение целевой мРНК KRAS и dРНК с вариантной длиной. На фиг. 4В показано редактирование мРНК эндогенного гена KRAS с помощью dРНК в клетках 293Т. Пустой вектор, плазмиды dРНК-91nt трансфицировали в клетки 293Т-WT, соответственно. Через 60 часов РНК выделяли для ПЦР с обратной транскрипцией, а затем кДНК амплифицировали и секвенировали на Illumina NextSeq. На фиг. 4С показано схематическое изображение целевой мРНК PPIB (сайт1, сайт2 и сайт3) и соответствующий дизайн dРНК. На фиг. 4D, 4Е и 4F показано редактирование мРНК эндогенного гена PPIB с помощью dРНК в клетках 293Т. На фиг. 4G показано схематическое изображение целевой мРНК β-актина и dРНК (71-nt и 131-nt-dRNA). На фиг. 4Н показано редактирование мРНК эндогенного гена β-актина с помощью dРНК в клетках 293Т.

[0030] На фиг. 5А-5G показан нецелевой анализ. На фиг. 5А показано схематическое изображение окна последовательности, где изменения А в I были проанализированы в отношении целевой мРНК PPIB (сайт 1 PPIB). Черная стрелка указывает на целевой аденозин. На фиг. 5В показано количественное определение глубокого секвенирования редактирования А в I РНК с помощью dРНК из 151 нуклеотидов (151-nt dRNA), нацеленной на целевую мРНК PPIB (сайт 1 PPIB). На фиг. 5С показано схематическое изображение окна последовательности, где изменения А в I были проанализированы в отношении целевой мРНК KRAS. Черная стрелка указывает на целевой аденозин. На фиг. 5D показано количественное определение глубокого секвенирования редактирования А в I РНК с помощью dРНК из 91 нуклеотида и 111 нуклеотида (91-nt и 111-nt dRNA), нацеленной на целевую мРНК KRAS. На фиг. 5Е показано схематическое изображение сконструированных четырех видов вариантов dРНК из 91 или 111 нуклеотидов (91-nt или 111-nt dRNA), содержащих различные комбинации ошибок спаривания А-Г. Ошибку спаривания А-Г рассчитывали на основе статистических результатов на фиг. 5D и существующих знаний о генных кодах для различных аминокислот. На фиг. 5F показаны результаты целевого редактирования A56 с помощью dРНК и различных видов вариантов dРНК на фиг. 5Е. На фиг. 5G показано количественное определение глубокого секвенирования редактирования А в I РНК с помощью dРНК из 111 нуклеотидов (111-

ntdRNA) и четырех видов вариантов dPHK из 111 нуклеотидов, нацеленной на целевую мPHK KRAS.

[0031] На фиг. 6A-6H показано редактирование PHK с применением одной dPHK с применением эндогенного белка ADAR1. На фиг. 6A схематически показано редактирование PHK слитыми белками dLbuCas13-ADARDD. Каталитически неактивный dLbuCas13 был слит с доменами PHK-дезаминазы ADAR1 или ADAR2. На фиг. 6B показано схематическое изображение двойственной флуоресцентной целевой репортерной мPHK и направляющей PHK. На фиг. 6C показан статистический анализ результатов на фиг. 6A и 6B. На фиг. 6D показан уровень мPHK ADAR1 и ADAR2 в клетках 293T-WT. На фиг. 6E показаны результаты генотипирования гена ADAR1 в клеточных линиях 293T-ADAR1-KO с помощью геномной ПЦР. На фиг. 6F показан уровень экспрессии ADAR1(p110) и ADAR1(p150) в клеточных линиях 293T-WT и 293T-ADAR1-KO с помощью вестерн-блоттинга. На фиг. 6G показано влияние избыточной экспрессии ADAR1(p110), ADAR1(p150) или ADAR2 на редактирование PHK, опосредованное dPHK, в клетках 293T-WT посредством FACS (метод анализа сортировки клеток с активированной флуоресценцией). На фиг. 6H продемонстрировано, что результаты секвенирования по Сэнгеру показали редактирование A в G в целевом сайте аденозина.

[0032] На фиг. 7A-7C показана оптимизация dPHK. На фиг. 7A схематически представлена dPHK с вариантной длиной и результаты редактирования целевой мPHK с помощью dPHK с вариантной длиной на основе репортера-1 двойственной флуоресценции. На фиг. 7B показано схематическое изображение различных положений ошибки спаривания A-C и влияние положения ошибки спаривания A-C на эффективность редактирования PHK на основе двойственной флуоресценции репортера-1. На фиг. 7C схематически показано различное положение ошибки спаривания A-C и влияние положения ошибки спаривания A-C на эффективность редактирования PHK на основе двойственной флуоресценции репортера-3.

[0033] На фиг. 8A-8B показано редактирование мPHK эндогенных генов с помощью dPHK в клетках 293T. На фиг. 8A показано редактирование мPHK эндогенного гена β -актина (сайт2) с помощью dPHK в клетках 293T. На фиг. 8B показано редактирование мPHK эндогенного гена GAPDH с помощью dPHK в клетках 293T.

[0034] На фиг. 9 показано редактирование PHK с помощью dPHK в различных клеточных линиях. На фиг. 9A показано, что репортерные плазмиды и плазмиды dPHK котрансфицировали в разные клеточные линии, и результаты показали, что dPHK может хорошо функционировать во многих клеточных линиях, что указывает на универсальность применения dPHK.

[0035] На фиг. 10A-10D показано исследование эффективной иллюстративной платформы редактирования РНК. На фиг. 10A показана схема слитого белка dLbuCas13a-ADAR1_{DD} (E1008Q) и соответствующей crРНК. Каталитически неактивный LbuCas13a был слит с дезаминазным доменом ADAR1 (гиперактивный вариант E1008Q) с применением линкера 3 × GGGGS. crРНК (crРНК^{Cas13a}) состояла из каркаса Lbu-crРНК и спейсера, который комплементарен нацеливающей РНК с ошибкой спаривания А-С, как указано. На фиг. 10B показана схема репортерной системы двойственной флуоресценции и Lbu-crРНК с различной длиной спейсеров, как указано. На фиг. 10C показано количественное определение клеток положительных по EGFP (EGFP⁺). Клетки HEK293T, стабильно экспрессирующие репортер-1, трансфицировали crРНК^{Cas13a} указанной длины, с или без коэкспрессии dLbuCas13a-ADAR1_{DD} (E1008Q), с последующим анализом FACS. Данные представлены как среднее значение ± стандартная ошибка среднего (n = 3). На фиг. 10D показан иллюстративный результат FACS эксперимента, проведенного с контролем (Ctrl crРНК₇₀) или целевым спейсером (crРНК₇₀).

[0036] На фиг. 11A-11G показаны иллюстративные способы применения эндогенного белка ADAR1 для целевого редактирования РНК. На фиг. 11A показана схема репортера-1 и arРНК из 70 нуклеотидов (70-nt arRNA). На фиг. 11B показан иллюстративный анализ FACS индуцированной arРНК экспрессии EGFP в клетках дикого типа (HEK293T, верхний) или с нокаутом ADAR1 (HEK293T ADAR1^{-/-}, нижний), стабильно экспрессирующих репортер-1. На фиг. 11C показан вестерн-блоттинг, демонстрирующий уровни экспрессии белков ADAR1 в клетках дикого типа и HEK293T ADAR1^{-/-}, а также в клетках HEK293T ADAR1^{-/-}, трансфицированных изоформами ADAR1 (p110 и p150). На фиг. 11D показан вестерн-блоттинг, показывающий уровни экспрессии белков ADAR2 в клетках дикого типа и HEK293T ADAR1^{-/-}, а также в клетках HEK293T ADAR1^{-/-}, трансфицированных ADAR2. На фиг. 11E показана количественная оценка клеток положительных по EGFP (EGFP⁺). Репортер-1 и указанные конструкции, экспрессирующие ADAR, котрансфицировали в клетки HEK293T ADAR1^{-/-} вместе с Ctrl РНК₇₀ или нацеливающей arРНК₇₀ с последующим анализом FACS. Процентное содержание EGFP⁺ нормализовали по эффективности трансфекции, которую определяли с помощью mCherry⁺. Данные представляют собой средние значения ± стандартная ошибка среднего (n = 4). На фиг. 11F показаны электрофореграммы, показывающие результаты секвенирования по Сэнгеру в целевой области Ctrl РНК₇₀ (вверху) или arРНК₇₀ (внизу). На фиг. 11G показана количественная оценка коэффициента конверсии А в I на целевом сайте путем глубокого секвенирования.

[0037] На фиг. 12A-12B показан уровень экспрессии мРНК ADAR1/ADAR2 и

редактирование РНК, опосредованное агРНК. На фиг. 12А показана количественная ПЦР, демонстрирующая уровни мРНК ADAR1 и ADAR2 в клетках HEK293T. Данные представлены как среднее значение $\pm$ стандартная ошибка среднего ($n = 3$). На фиг. 12В показаны иллюстративные результаты FACS фиг. 1Е.

[0038] На фиг. 13 показаны результаты количественной ПЦР, демонстрирующие влияние иллюстративного способа LEAPER на уровни экспрессии целевых транскриптов репортер-1 с помощью агРНК из 111 нуклеотидов (111-nt agRNA) или контрольной РНК в клетках HEK293T. Данные представлены как среднее значение $\pm$ стандартная ошибка среднего ($n = 3$), непарный двусторонний t-критерий Стьюдента, ns означает незначимый.

[0039] На фиг. 14А-14D показано редактирование целевой РНК с помощью иллюстративного способа LEAPER в нескольких клеточных линиях. На фиг. 14А показаны результаты вестерн-блоттинга, демонстрирующие уровни экспрессии ADAR1, ADAR2 и ADAR3 в указанных клеточных линиях человека. β -тубулин применяли в качестве контроля нагрузки. Показанные данные являются иллюстративными для трех независимых экспериментов. ADAR1^{-/-}/ADAR2 представляет собой клетки HEK293T с нокаутом по ADAR1, сверхэкспрессирующие ADAR2. На фиг. 14В показаны относительные уровни экспрессии белка ADAR, нормализованные по экспрессии β -тубулина. На фиг. 14С показано, что указанные человеческие клетки трансфицировали репортером-1 вместе с контрольной агРНК из 71 нуклеотида (Ctrl РНК₇₁) или нацеливающей агРНК из 71 нуклеотида (agРНК₇₁) с последующим анализом FACS. На фиг. 14D показано, что указанные клеточные линии мыши анализировали, как описано на фиг. 14С. Процентное содержание EGFP⁺ нормализовали по эффективности трансфекции, которую определяли с помощью mCherry⁺. Планки погрешностей на фиг. 14В, 14С и 14D все указывают среднее значение $\pm$ стандартная ошибка среднего ($n = 3$), непарный двусторонний t-критерий Стьюдента, *P<0,05, **P<0,01, ***P<0,001, ****P<0,0001, ns означает незначимый.

[0040] На фиг. 15А-15С показаны схемы репортера-1 (фиг. 15А), -2 (фиг. 15В) и -3 (фиг. 15С), а также их соответствующих агРНК.

[0041] На фиг. 16А-16G показаны характеристики и оптимизация иллюстративных способов LEAPER. На фиг. 16А, вверху, показана схема конструкции агРНК с измененным триплетом (5'-CNA, N обозначает A, U, C или G), противоположным целевому UAG. Внизу: процент EGFP⁺, показывающий влияние переменных оснований, противоположных целевому аденозину, на эффективность редактирования РНК. На фиг. 16В, вверху, показана конструкция агРНК с измененными соседними основаниями, фланкирующими цитидин в случае ошибки спаривания А-С (5'-N¹CN²). Внизу показано влияние 16 различных комбинаций N¹CN² на эффективность редактирования РНК. На фиг. 16С кратко показано

предпочтение 5' и 3' ближайших соседних сайтов цитидина в ошибочно спаренных А-С. На фиг. 16D, вверху, показана конструкция агРНК переменной длины. Внизу показано влияние длины агРНК на эффективность редактирования РНК на основе репортера-1 и репортера-2. На фиг. 16E, вверху, показана конструкция агРНК с переменной позицией ошибки спаривания А-С. Внизу показано влияние положения ошибки спаривания А-С на эффективность редактирования РНК на основе репортера-1 и репортера-2. На фиг. 16F, вверху, показана конструкция триплетных мотивов в репортере-3 с переменными ближайшими соседними основаниями, окружающими целевой аденозин (5'-N¹AN²) и противоположный мотив (5'-N¹CN²) на агРНК из 111 нуклеотидов (агРНК₁₁₁). Внизу показаны результаты глубокого секвенирования, показывающие скорость редактирования целевого аденозина в мотиве 5'-N¹AN². На фиг. 16G кратко показаны предпочтения оснований 5' и 3' при опосредованном LEAPER редактировании в репортере-3. Планки погрешностей на фиг. 16A, 16B, 16D, 16E и 16F все указывают средние значения $\pm$ стандартная ошибка среднего (n = 3).

[0042] На фиг. 17A-17I показано редактирование эндогенных транскриптов с помощью иллюстративных способов LEAPER. На фиг. 17A показана схема нацеливания эндогенных транскриптов четырех связанных с заболеванием генов (PPIB, KRAS, SMAD4 и FANCC) и соответствующие агРНК. На фиг. 17B показаны результаты глубокого секвенирования, показывающие скорость редактирования целевого аденозина транскриптов PPIB, KRAS, SMAD4 и FANCC путем введения агРНК указанной длины. На фиг. 17C показаны результаты глубокого секвенирования, показывающие скорость редактирования на не-UAN сайтах эндогенных транскриптов PPIB, FANCC и IDUA. На фиг. 17D показана скорость мультиплексного редактирования двумя агРНК из 111 нуклеотидов. Указанные агРНК трансфицировали отдельно или котрансфицировали в клетки HEK293T. Целевое редактирование на двух сайтах измеряли для котрансфицированных клеток. На фиг. 17E показана схема последовательности транскрипта PPIB, покрытого агРНК из 151 нуклеотида. Черная стрелка указывает на целевой аденозин. Все аденозины отмечены красным. На фиг. 17F представлена тепловая карта скорости редактирования аденозинов, покрытых агРНК указанной длины, нацеленной на ген PPIB (отмечены жирной рамкой синим цветом). Для области, покрытой агРНК из 111 нуклеотидов или агРНК₁₅₁-PPIB, скорости редактирования A22, A30, A33 и A34 определяли с помощью секвенирования РНК из-за отсутствия эффективных праймеров ПЦР для амплификации данной области. В противном случае скорость редактирования определяли целевым анализом глубокого секвенирования. На фиг. 17G вверху, показана конструкция триплетных мотивов в репортере-3 с переменными ближайшими соседними

основаниями, окружающими целевой аденозин (5'-N¹AN²) и противоположный мотив (5'-N²'GN¹') в агРНК из 111 нуклеотидов (111-nt arRNA) (arРНК₁₁₁). Внизу показаны результаты глубокого секвенирования, демонстрирующие скорость редактирования. На фиг. 17H, вверху, показана конструкция агРНК с двумя последовательными ошибками спаривания в мотиве 5'-N¹GN², противоположном мотивам 5'-UAG или 5'-AAG. Результаты глубокого секвенирования, показывающие скорость редактирования с помощью агРНК₁₁₁ с двумя последовательными ошибками спаривания в мотиве 5'-N¹GN², противоположном мотиву 5'-UAG (внизу слева) или мотиву 5'-AAG (внизу справа). На фиг. 17I показана тепловая карта скорости редактирования аденозинов, покрытых сконструированными вариантами агРНК₁₁₁, нацеленными на ген KRAS. Данные на фиг. 17B, 17C, 17D, 17G и 17H представлены как средние значения $\pm$ стандартная ошибка среднего ($n = 3$), непарный двусторонний t-критерий Стьюдента, * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$, **** $P < 0,0001$, ns означает незначимый. Данные в (f и i) представлены как среднее значение ($n = 3$).

[0043] На фиг. 18A-18B показано влияние иллюстративных способов LEAPER на уровне экспрессии целевых транскриптов и белковых продуктов. На фиг. 18A показана количественная ПЦР, показывающая уровни экспрессии целевых транскриптов из PPIB, KRAS, SMAD4 и FANCC, с помощью соответствующей агРНК из 151 нуклеотида или контрольной РНК в клетках HEK293T. Данные представлены как среднее значение $\pm$ стандартная ошибка среднего ($n = 3$), непарный двусторонний t-критерий Стьюдента, * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$, **** $P < 0,0001$, ns означает незначимый. На фиг. 18B показаны результаты вестерн-блоттинга, показывающие влияние на белковые продукты целевого гена KRAS агРНК из 151 нуклеотида в клетках HEK293T. β -тубулин применяли в качестве контроля нагрузки.

[0044] На фиг. 19A-19F показано редактирование эндогенных транскриптов с помощью иллюстративных способов LEAPER. На фиг. 19A показана схема последовательности транскрипта KARS, покрытого агРНК из 151 нуклеотида. Стрелка указывает на целевой аденозин. Все аденозины отмечены красным. На фиг. 19B показана тепловая карта скорости редактирования аденозинов, покрытых указанными агРНК в транскрипте KARS (отмечены жирной рамкой синим цветом). На фиг. 19C показана схема транскрипта SMAD4, покрытого агРНК из 151 нуклеотида. На фиг. 19D показана тепловая карта скорости редактирования аденозинов, покрытых указанными агРНК в транскрипте SMAD4. На фиг. 19E показана схема транскрипта FANCC, покрытого агРНК из 151 нуклеотида. На фиг. 19F показана тепловая карта скорости редактирования аденозинов, покрытых указанными агРНК в транскрипте FANCC. Для каждой агРНК область дуплексной РНК выделена жирной рамкой синего цвета. Данные (фиг. 19B, 19D и 19F)

представлены как среднее значение ($n = 3$).

[0045] На фиг. 20A-20D показана транскриптомная специфичность редактирования РНК с помощью LEAPER. На фиг. 20A и 20B показан нецелевой анализ транскриптома Ctrl РНК₁₅₁ и агРНК₁₅₁-PPIB. Целевой сайт (PPIB) выделен красным. Потенциальные нецелевые сайты, идентифицированные как в группах Ctrl РНК, так и в группах РНК, нацеливающих PPIB, отмечены синим цветом. На фиг. 20C показана прогнозируемая аффинность отжига между нецелевыми сайтами и соответствующей Ctrl РНК₁₅₁ или агРНК₁₅₁-PPIB. Минимальная свободная энергия (ΔG) двухцепочечной РНК, образованной нецелевыми сайтами (150 нуклеотидов выше и ниже сайтов редактирования) и соответствующей Ctrl РНК₁₅₁ или агРНК₁₅₁-PPIB, была предсказана с помощью инструмента в сети Интернет в режиме онлайн RNAhybrid. На фиг. 20D, сверху, показано схематическое изображение высоко комплементарной области между агРНК₁₅₁-PPIB и указанными потенциальными нецелевыми сайтами, которые были предсказаны путем поиска гомологичных последовательностей с помощью NCBI-BLAST. Внизу показано глубокое секвенирование, показывающее скорость редактирования на целевом сайте и всех предсказанных нецелевых сайтах агРНК₁₅₁-PPIB. Данные представлены как среднее значение $\pm$ стандартная ошибка среднего ($n = 3$).

[0046] На фиг. 21A-21B показана оценка потенциальных нецелевых объектов. На фиг. 21A показано схематическое изображение высоко комплементарной области агРНК₁₁₁-FANCC и указанной потенциальной нецелевой последовательности, которые были предсказаны путем поиска гомологичных последовательностей с помощью NCBI-BLAST. На фиг. 21B показано глубокое секвенирование, показывающее скорость редактирования на целевом сайте и всех предсказанных нецелевых сайтах агРНК₁₁₁-FANCC. Все данные представлены как среднее значение $\pm$ стандартная ошибка среднего ($n = 3$).

[0047] На фиг. 22A-22F показана оценка безопасности применения иллюстративных способов LEAPER в клетках млекопитающих. На фиг. 22A и 22B представлен транскриптомный анализ влияния Ctrl РНК₁₅₁ (a) агРНК₁₅₁-PPIB (b) на нативные сайты редактирования посредством секвенирования РНК в масштабе всего транскриптома. Анализ коэффициента корреляции Пирсона применяли для оценки дифференциальной скорости редактирования РНК на собственных сайтах редактирования. На фиг. 22C и 22D показан дифференциальный анализ экспрессии генов эффектов Ctrl РНК₁₅₁ (c) агРНК₁₅₁-PPIB (d) с данными секвенирования РНК на уровне транскриптома. Для оценки дифференциальной экспрессии генов применяли анализ коэффициента корреляции Пирсона. На фиг. 22E и 22F показано влияние трансфекции агРНК на врожденный иммунный ответ. Указанные агРНК или поли(I:C) трансфицировали в клетки HEK293T.

Затем общую РНК анализировали с помощью количественной ПЦР для определения уровней экспрессии IFN- β (е) и IL-6 (f). Данные (е и f) представлены как среднее $\pm$ стандартная ошибка среднего (n = 3).

[0048] На фиг. 23А-23D показано восстановление транскрипционной регуляторной активности мутанта TP53W53X с помощью LEAPER. На фиг. 23А, вверху, показано схематическое изображение последовательности транскрипта TP53, покрытого агРНК из 111 нуклеотидов, содержащей с.158G>А клинически значимую несмысловую мутацию (Trp53Ter). Черная стрелка указывает на целевой аденозин. Все аденозины отмечены красным. Внизу, показана конструкция двух оптимизированных агРНК, нацеленных на транскрипты TP53^{W53X}, с ошибкой спаривания А-Г на А⁴⁶ для агРНК₁₁₁-AG1 и на А¹⁶, А⁴⁶, А⁹¹ и А⁹⁴ вместе для агРНК₁₁₁-AG4, чтобы минимизировать потенциальные нецелевые на "склонных к редактированию" мотивах. На фиг. 23В показаны результаты глубокого секвенирования, показывающие целевое редактирование транскриптов TP53^{W53X} с помощью агРНК₁₁₁, агРНК₁₁₁-AG1 и агРНК₁₁₁-AG4. На фиг. 23С представлен вестерн-блоттинг, показывающий восстановленную продукцию полноразмерного белка p53 из транскриптов TP53^{W53X} в клетках НЕК293Т TP53^{-/-}. На фиг. 23D показано обнаружение транскрипционной регуляторной активности восстановленного белка p53 с применением репортерной системы p53-люцифераза Firefly (светлячка), нормализованной по котрансфицированному вектору люцифераза Renilla. Данные (b, c и d) представлены как среднее значение $\pm$ стандартная ошибка среднего (n = 3), непарный двусторонний t-критерий Стьюдента, *P <0,05, **P <0,01, ***P <0,001, ****P <0,0001, ns означает незначимый.

[0049] На фиг. 24 показано редактирование мутантных транскриптов TP53W53X с помощью иллюстративного способа LEAPER. Вверху показано схематическое изображение последовательности транскрипта TP53, покрытого агРНК из 111 нуклеотидов. Стрелка указывает на целевой аденозин. Все аденозины отмечены красным. Внизу показана тепловая карта скорости редактирования аденозинов, покрытых указанными агРНК в транскрипте TP53.

[0050] На фиг. 25 показано схематическое изображение выбранной связанной с заболеванием кДНК, содержащей мутацию G в А, из данных ClinVar и соответствующей агРНК из 111 нуклеотидов (111-nt).

[0051] На фиг. 26 показана коррекция патогенных мутаций с помощью иллюстративного способа LEAPER. Коррекция А в Г мутации G>А, связанной с заболеванием, из данных ClinVar с помощью соответствующей агРНК из 111 нуклеотидов, направленной на клинические мутации шести патогенных генов, как указано (фиг. 25 и

таблицы последовательностей агРНК и контрольных РНК и кДНК, относящихся к заболеванию, внизу). Данные представлены как среднее значение $\pm$ стандартная ошибка среднего ($n = 3$), непарный двусторонний t-критерий Стьюдента, * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$, **** $P < 0,0001$, ns означает незначимый.

[0052] На фиг. 27А-27С показано редактирование РНК в множественных первичных клетках человека с помощью иллюстративного способа LEAPER. На фиг. 27А показана количественная оценка клеток положительных по EGFP (EGFP⁺), индуцированных LEAPER-опосредованным редактированием РНК. Первичные легочные фибробласты человека и первичные эпителиальные клетки бронхов человека трансфицировали репортером-1 вместе с контрольной РНК из 151 нуклеотида (Ctrl РНК₁₅₁) или целевой агРНК из 151 нуклеотида (агРНК₁₅₁) с последующим анализом FACS. На фиг. 27В и 27С показаны результаты глубокого секвенирования, показывающие скорость редактирования транскриптов РР1В в первичных легочных фибробластах человека, первичных бронхиальных эпителиальных клетках человека (b) и первичных Т-клетках человека (c). Данные в а, b и в необработанной группе (c) представлены как среднее значение $\pm$ стандартная ошибка среднего ($n = 3$), данные Ctrl РНК₁₅₁ и агРНК₁₅₁ (c) представлены в виде среднего значения $\pm$ стандартная ошибка среднего ($n = 2$).

[0053] На фиг. 28А-28D показано целевое редактирование с помощью лентивирусной трансдукции агРНК и электропорации синтезированных олигонуклеотидов агРНК. На фиг. 28А показана количественная оценка клеток EGFP⁺. Клетки НЕК293Т, стабильно экспрессирующие репортер-1, инфицировали лентивирусом, экспрессирующим Ctrl РНК из 151 нуклеотида или нацеливающая агРНК. Анализы FACS проводили через 2 дня и 8 дней после заражения. Соотношения клеток EGFP⁺ нормализовали по эффективности лентивирусной трансдукции (отношения BFP⁺). На фиг. 28В показаны результаты глубокого секвенирования, показывающие скорость редактирования транскриптов РР1В при лентивирусной трансдукции агРНК из 151 нуклеотидов в клетки НЕК293Т. На фиг. 28С показана схема последовательности РР1В и соответствующей нацеливающей агРНК из 111 нуклеотидов. *(Красный) представляет собой нуклеотид с 2'-О-метилированием и фосфоротиоатной связью. На фиг. 28D представлены результаты глубокого секвенирования, показывающие скорость редактирования транскриптов РР1В при электропорации синтетических олигонуклеотидов агРНК из 111 нуклеотидов в первичные Т-клетки человека.

[0054] На фиг. 29А-29Е показано восстановление активности α -L-идуронидазы в первичных фибробластах, полученных от пациента с синдромом Гурлера, с помощью иллюстративного способа LEAPER. На фиг. 29А, вверху, показана генетическая

информация о патогенной мутации в фибробласте GM06214, полученном от пациента, в середине показано схематическое изображение последовательности зрелой мРНК IDUA клеток GM06214 (черный), содержащей гомозиготную мутацию TGG>TAG в экзоне 9 гена IDUA (Trp402Ter), и соответствующей целевой arPHK₁₁₁-IDUA-V1 из 111 нуклеотидов (синий), внизу показано схематическое изображение последовательности пре-мРНК IDUA клеток GM06214 (черный) и соответствующей целевой arPHK₁₁₁-IDUA-V2 из 111 нуклеотидов (синий). *(Красный) представляет нуклеотиды с 2'-О-метилованием и фосфоротиоатной связью. На фиг. 29В показано измерение каталитической активности α -L-идуронидазы с субстратом 4-метилумбеллиферил α -L-идуронидазы в различные моменты времени. Данные представлены как среднее значение $\pm$ стандартная ошибка среднего (n = 2). На фиг. 29С показаны результаты глубокого секвенирования, показывающие целевую скорость редактирования транскриптов IDUA в клетках GM06214 через 48 часов после электропорации. На фиг. 29D, вверху, показано схематическое изображение последовательности транскрипта IDUA, покрытого arPHK из 111 нуклеотидов. Стрелка указывает на целевой аденозин. Все аденозины отмечены красным. Внизу показана тепловая карта скорости редактирования аденозинов, покрытых указанными arPHK в транскрипте IDUA (отмечены жирной рамкой синим цветом), е Количественная ПЦР, показывающая экспрессию интерферона I типа, генов, стимулированных интерфероном, и провоспалительных генов при arPHK или поли(I:C) электропорации. Данные представлены как среднее значение (n = 3).

[0055] На фиг. 30А-30С показаны три версии репортеров двойственной флуоресценции (Репортер-1, -2 и -3), mCherry и EGFP. На фиг. 30А показана структура репортера-1, на фиг. 30В показана структура репортера-2, и на фиг. 30С показана структура репортера-3.

[0056] На фиг. 31 показана структура pLenti-dCas13-ADAR1DD.

[0057] На фиг. 32 показана структура каркаса pLenti-MCS-mCherry.

[0058] На фиг. 33 показана структура каркаса pLenti-arPHK-BFP.

[0059] На фиг. 34 показан обнаруженный генотип IDUA в клетках GM06214. В геноме обнаружена мутация C1205 G> A.

[0060] На фиг. 35 показан результат теста условий электротрансфекции клеток.

[0061] На фиг. 36 показана ферментативная активность IDUA и скорость желаемой мутации в клетках, трансфицированных dPHK, предназначенными для нацеливания на пре-мРНК и мРНК IDUA с применением электропорации, соответственно.

[0062] На фиг. 37А-37В показан тест с применением репортера IDUA. На фиг. 37А показана конструкция репортера IDUA. На фиг. 37В показана эффективность

редактирования dPHK разной длины (симметричные усечения) в клетках 293T-IDUA-репортер с применением электропорации (клетки 293T с репортером IDUA).

[0063] На фиг. 38 показана ферментативная активность и эффективность редактирования, определенные в разные моменты времени в клетках GM06214, электротрансфицированных dPHK разной длины (симметричные усечения).

[0064] На фиг. 39A-39B показана определенная ферментативная активность IDUA (фиг. 39A) и частота мутаций А в G (фиг. 39B) в клетках, трансфицированных различными dPHK (симметричные усечения, 3'-концевые усечения и 5'-концевые усечения) с применением липофектамина RNAiMAX.

[0065] На фиг. 40A-40B показано сравнение ферментативных активностей в клетках GM06214, трансфицированных dPHK разной длины с применением липофектамина RNAiMAX. На фиг. 40A показано, что основания на 3'-конце dPHK восстанавливали одно за другим с 55-с-25 до 55-с-10. На фиг. 40B показано, что основания на 3'-конце dPHK восстанавливали одно за другим с 55-с-16 до 55-с-5.

[0066] На фиг. 41 показано сравнение ферментативных активностей в клетках GM06214, трансфицированных dPHK разной длины (длина 3'-конца исправлена на 15 нуклеотидов или 20 нуклеотидов (нт), в то время как длина 5'-конца была постепенно уменьшена) с применением липофектамина RNAiMAX.

[0067] На фиг. 42 показано сравнение ферментативных активностей в клетках GM06214, трансфицированных 3 группами dPHK с применением липофектамина RNAiMAX. Для dPHK в каждой группе расстояние от целевого нуклеотида до 5'-конца различается. На фигуре также показана низкая эффективность редактирования dPHK размером менее 60 нуклеотидов (нт).

[0068] На фиг. 43A-43B показана эффективность редактирования dPHK из 71 нуклеотида (нт) и 76 нуклеотидов (нт) с различными химическими модификациями. На фиг. 43A показана эффективность редактирования с применением ферментативной активности. На фиг. 43B показана эффективность редактирования с применением скорости А в G.

[0069] На фиг. 44 показано сравнение ферментативной активности в клетках, трансфицированных с помощью dPHK по настоящему изобретению, и предпочтительной РНК для независимого от экзогенного фермента редактирования оснований РНК в предшествующем уровне техники.

[0070] На фиг. 45A-45D показаны результаты редактирования РНК мутации в модели USH2A (с.11864 G> A, p.Trp3955*) с применением химически модифицированных dPHK по настоящему изобретению. Показатели MFI и %GFP представляют собой эффективность редактирования. На фиг. 45A показана конструкция USH2A конструкции.

На фиг. 45B показана эффективность редактирования dPНК с 3'- и 5'-концами одинаковой длины. На фиг. 45C показана эффективность редактирования dPНК с 3'- и 5'-концами разной длины. На фиг. 45D показана относительно низкая эффективность редактирования dPНК менее 60 нуклеотидов.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0071] Настоящее изобретение относится к способам редактирования РНК (называемые в настоящем документе "способами LEAPER") и специально разработанным РНК, называемым в настоящем документе РНК, рекрутирующими дезаминазу ("dPНК"), или РНК, рекрутирующими ADAR ("arPНК"), для редактирования целевой РНК в клетке-хозяин. Не ограничиваясь какой-либо теорией или гипотезой, dPНК действует через гибридизацию со своей целевой РНК специфическим для последовательности образом с образованием двухцепочечной РНК, которая привлекает аденозиндезаминазу, действующую на РНК (ADAR), для дезаминирования целевого аденозина в целевой РНК. Таким образом, эффективное редактирование РНК может быть достигнуто в некоторых вариантах осуществления без эктопической или избыточной экспрессии белков ADAR в клетке-хозяин. Настоящее изобретение относится к способам и композициям для лечения или профилактики заболевания или состояния у индивидуума с применением способов редактирования РНК.

[0072] В описанных в настоящем документе способах редактирования РНК не применяют слитые белки, содержащие ADAR и белок, который специфически связывается с направляющей нуклеиновой кислотой, такой как Cas. Описанные в настоящем документе РНК, рекрутирующие дезаминазу ("dPНК"), не содержат sgPНК, tracrPНК или gPНК, применяемые в системе CRISPR/Cas. В некоторых вариантах осуществления dPНК не содержит домен, рекрутирующий ADAR, или химическую модификацию(и). В некоторых вариантах осуществления arPНК может быть экспрессирована из плазмиды или вирусного вектора или может быть синтезирована как олигонуклеотид, что может обеспечить желаемую эффективность редактирования. Не ограничиваясь какой-либо теорией или лежащим в основе механизмом, было обнаружено, что определенные dPНК с определенной длиной, положением ошибки спаривания и/или паттерном модификации демонстрируют более высокую эффективность при редактировании РНК. Настоящее изобретение, таким образом, дополнительно обеспечивает улучшенные способы редактирования РНК по сравнению с ранее описанными.

[0073] Способы LEAPER, описанные в настоящем документе, имеют контролируемые скорости отклонения от цели для целевых транскриптов и редкие

глобальные отклонения от цели. Авторы изобретения применяли способ LEAPER для восстановления функции p53 путем восстановления конкретной точечной мутации, связанной с раком. Описанные в настоящем документе способы LEAPER также могут применяться к широкому спектру типов клеток, включая множество первичных клеток человека, и могут применяться для восстановления каталитической активности α -L-идуронидазы в первичных фибробластах, полученных от пациентов с синдромом Гурлера, без индуцирования врожденных иммунных ответов. В некоторых вариантах осуществления способ LEAPER включает систему из одной молекулы (т.е. dPHK). Описанные в настоящем документе способы LEAPER обеспечивают точное и эффективное редактирование РНК, которое обладает трансформационным потенциалом для фундаментальных исследований и терапии.

Определения

[0074] Настоящее изобретение описано в соответствии с конкретными вариантами осуществления и со ссылкой на определенные графические материалы, но изобретение не ограничено ими, а только формулой изобретения. Любые ссылочные позиции в формуле изобретения не должны рассматриваться как ограничивающие объем. Если в настоящем описании и формуле изобретения используется термин "содержащий", он не исключает другие элементы или стадии. В контексте настоящего документа формы единственного числа слов включают соответствующие им формы множественного числа, если контекст явно не подразумевает иное. В контексте настоящего документа в перечисляемые числовые диапазоны нуклеотидов явно включено каждое промежуточное число. Например, в диапазоне от 40 до 260 нуклеотидов рассматривается любое целое число нуклеотидов от 40 до 260 нуклеотидов в дополнение к 40 и 260 нуклеотидам.

[0075] Нижеследующие термины или определения представлены исключительно для понимания настоящего изобретения. Если в настоящем документе не указано иное, все используемые в настоящем документе термины имеют то же значение, что и для специалиста в данной области техники. Практикующим специалистам особенно рекомендуется обратиться к публикациям Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed., Cold Spring Harbor Press, Plainville, New York (1989), и Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology* (Supplement 47), John Wiley & Sons, New York (1999), для изучения определений и терминов в данной области техники. Приведенные в настоящем документе определения имеют объем не меньший, чем понимаемый специалистом в данной области техники.

[0076] В контексте настоящего документа термины "dPHK", "PHK, рекрутирующая дезаминаза", "PHK, рекрутирующая ADAR" и "arPHK" используются взаимозаменяемо для

обозначения сконструированной РНК, способной рекрутировать ADAR для дезаминирования целевого аденозина в РНК.

[0077] Термины "полинуклеотид", "нуклеотидная последовательность" и "нуклеиновая кислота" используются взаимозаменяемо. Они относятся к полимерной форме нуклеотидов любой длины, дезоксирибонуклеотидов или рибонуклеотидов или их аналогов. Два нуклеотида связаны фосфодиэфирной связью, а несколько нуклеотидов связаны фосфодиэфирными связями с образованием полинуклеотида или нуклеиновой кислоты. Связь между нуклеотидами может представлять собой фосфоротионатную, называемую "фосфоротионатная связь" или "фосфоротионированная связь".

[0078] Термины "аденин", "гуанин", "цитозин", "тимин", "урацил" и "гипоксантин" в контексте настоящего документа относятся к нуклеиновым основаниям как таковым. Термины "аденозин", "гуанозин", "цитидин", "тимидин", "уридин" и "инозин" относятся к нуклеиновым основаниям, связанным с рибозным или дезоксирибозным сахарным фрагментом. Термин "нуклеозид" относится к нуклеиновому основанию, связанному с рибозой или дезоксирибозой. Термин "нуклеотид" относится к соответствующему нуклеиновому основанию-рибозилфосфату или нуклеиновому основанию-дезоксирибозилфосфату. Иногда термины аденозин и аденин (сокращенно "А"), гуанозин и гуанин (сокращенно "G"), цитозин и цитидин (сокращенно "С"), урацил и уридин (сокращенно "U"), тимин и тимидин (сокращенно "Т"), инозин и гипоксантин (сокращенно "I") используются взаимозаменяемо для обозначения соответствующего нуклеинового основания, нуклеозида или нуклеотида. Иногда термины нуклеиновое основание, нуклеозид и нуклеотид используются взаимозаменяемо, если контекст явно не предусматривает иное.

[0079] В контексте настоящего документа термин "целевая РНК" относится к последовательности РНК, для которой последовательность РНК, рекрутирующая дезаминазу, разработана так, чтобы иметь полную комплементарность или существенную комплементарность, а гибридизация между целевой последовательностью и dРНК образует двуцепочечную область РНК (дцРНК), содержащую целевой аденозин, рекрутирующую аденозиндезаминазу, действующую на РНК (ADAR), которая дезаминирует целевой аденозин. В некоторых вариантах осуществления ADAR естественно присутствует в клетке-хозяине, такой как эукариотическая клетка (предпочтительно, клетка млекопитающего, более предпочтительно клетка человека). В некоторых вариантах осуществления ADAR вводят в клетку-хозяин.

[0080] В контексте настоящего документа термин "комплементарность" относится к способности нуклеиновой кислоты образовывать водородную(ые) связь(и) с другой

нуклеиновой кислотой посредством традиционного спаривания оснований Уотсона-Крика. Процент комплементарности указывает процент остатков в молекуле нуклеиновой кислоты, которые могут образовывать водородные связи (то есть спаривание оснований Уотсона-Крика) со второй нуклеиновой кислотой (например, примерно 5, 6, 7, 8, 9, 10 из 10, комплементарными примерно на 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % и 100 % соответственно). "Полностью комплементарный" означает, что все смежные остатки последовательности нуклеиновой кислоты образуют водородные связи с одинаковым количеством смежных остатков во второй последовательности нуклеиновой кислоты. "По существу комплементарный" в контексте настоящего описания относится к степени комплементарности, которая составляет по меньшей мере примерно 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 % или 100 % в области примерно 40, 50, 60, 70, 80, 100, 150, 200, 250 или более нуклеотидов, или относится к двум нуклеиновым кислотам, которые гибридизуются в жестких условиях.

[0081] В контексте настоящего документа термин "жесткие условия" для гибридизации относится к условиям, при которых нуклеиновая кислота, комплементарная целевой последовательности, преимущественно гибридизируется с целевой последовательностью и по существу не гибридизуется с нецелевыми последовательностями. Жесткие условия обычно зависят от последовательности и варьируются в зависимости от ряда факторов. Как правило, чем длиннее последовательность, тем выше температура, при которой последовательность специфически гибридизируется со своей целевой последовательностью. Неограничивающие примеры жестких условий подробно описаны в публикации Tijssen (1993), *Laboratory Techniques In Biochemistry And Molecular Biology- Hybridization With Nucleic Acid Probes Part I, Second Chapter "Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid probe assay"*, Elsevier, N.Y.

[0082] "Гибридизация" относится к реакции, где один или более полинуклеотидов реагируют с образованием комплекса, стабилизирующегося за счет водородной связи между основаниями нуклеотидных остатков. Водородная связь может возникать путем спаривания оснований по Уотсон-Крику, связывания Хугштейна или любым другим специфическим для последовательности способом. Последовательность, способная гибридизоваться с данной последовательностью, называется "комплемент" данной последовательности.

[0083] В контексте настоящего документа термины "клетка", "клеточная линия" и "клеточная культура" используются взаимозаменяемо, и все такие обозначения включают потомство. Подразумевается, что все потомство не может быть точно идентичным по

содержанию ДНК из-за преднамеренных или случайных мутаций. Включены варианты потомства, которые обладают той же функцией или биологической активностью, что и исходные клетки.

Способы редактирования РНК

[0084] dРНК по настоящему изобретению включает последовательность РНК, содержащую цитидин (C), аденозин (A) или уридин (U), прямо противоположный целевому аденозину, подлежащему редактированию в целевой РНК при связывании с целевой РНК. Цитидин (C), аденозин (A) и уридин (U), прямо противоположные целевому аденозину, вместе называются "нацеливающим нуклеотидом" или по отдельности "нацеливающий C", "нацеливающий A" и "нацеливающий U". Нацеливающий нуклеотид и два нуклеотида, непосредственно прилегающие к нацеливающему нуклеотиду, образуют триплет, который в данном документе именуется "нацеливающим триплетом".

[0085] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способу редактирования целевой РНК в клетке-хозяине (например, эукариотической клетке), включающему введение РНК, рекрутирующей дезаминазу (dРНК), или конструкции, кодирующей dРНК, в клетку-хозяина, где dРНК содержит комплементарную последовательность РНК, которая гибридизуется с целевой РНК, и где dРНК способна рекрутировать аденозиндезаминазу, действующую на РНК (ADAR), для дезаминирования целевого аденозина (A) в целевой РНК.

[0086] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способу редактирования целевой РНК в клетке-хозяине (например, эукариотической клетке), включающему введение dРНК или конструкции, кодирующей dРНК, в клетку-хозяина, где dРНК содержит комплементарную последовательность РНК, которая гибридизуется с целевой РНК, и где dРНК рекрутирует эндогенно экспрессируемую ADAR клетки-хозяина для дезаминирования целевого A в целевой РНК. В некоторых вариантах осуществления способ не включает введение в клетку-хозяина какого-либо белка или конструкции, кодирующей белок (например, Cas, ADAR или слитого белка ADAR и Cas).

[0087] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способу редактирования целевой РНК в клетке-хозяине (например, эукариотической клетке), включающему введение: (a) dРНК или конструкции, кодирующей dРНК, и (b) ADAR или конструкции, кодирующей ADAR, в клетку-хозяина, где dРНК содержит комплементарную последовательность РНК, которая гибридизуется с целевой РНК, и где dРНК рекрутирует ADAR для дезаминирования целевого A в целевой РНК. В некоторых вариантах осуществления ADAR представляет собой эндогенно кодируемую ADAR клетки-хозяина, где введение ADAR включает сверхэкспрессию ADAR в клетке-хозяине. В

некоторых вариантах осуществления ADAR является экзогенной по отношению к клетке-хозяину. В некоторых вариантах осуществления конструкция, кодирующая ADAR, представляет собой вектор, такой как плаزمид, или вирусный вектор (например, лентивирусный вектор).

[0088] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способу редактирования множества (например, по меньшей мере примерно 2, 3, 4, 5, 10, 20, 50, 100 или более) целевых РНК в клетках-хозяин (например, эукариотических клетках), включающему введение множества dРНК или конструкций, кодирующих множество dРНК, в клетку-хозяина, где каждая dРНК содержит комплементарную последовательность РНК, которая гибридизуется с соответствующей целевой РНК во множестве целевых РНК, и где каждая dРНК способна рекрутировать ADAR для дезаминирования целевого А в соответствующей целевой РНК.

[0089] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способу редактирования множества (например, по меньшей мере примерно 2, 3, 4, 5, 10, 20, 50, 100 или более) целевых РНК в клетках-хозяин (например, эукариотических клетках), включающему введение множества dРНК или конструкций, кодирующих множество dРНК, в клетку-хозяин, где каждая dРНК содержит комплементарную последовательность РНК, которая гибридизуется с соответствующей целевой РНК во множестве целевых РНК, и где каждая dРНК рекрутирует эндогенно экспрессируемую ADAR для дезаминирования целевого А в соответствующей целевой РНК.

[0090] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способу редактирования множества (например, по меньшей мере примерно 2, 3, 4, 5, 10, 20, 50, 100, 1000 или более) целевых РНК в клетках-хозяин (например, эукариотических клетках), включающему введение: (а) множества dРНК или конструкций, кодирующих множество dРНК, и (b) ADAR или конструкцию, кодирующую ADAR, в клетки-хозяин, где каждая dРНК содержит комплементарную последовательность РНК, которая гибридизуется с соответствующей целевой РНК во множестве целевых РНК, и где каждая dРНК рекрутирует ADAR для дезаминирования целевого А в соответствующей целевой РНК.

[0091] В одном аспекте настоящее изобретение относится к способу редактирования множества РНК в клетках-хозяин путем введения множества РНК, рекрутирующих дезаминазу, одной или более конструкций, кодирующих РНК, рекрутирующих дезаминазу, или библиотеки по настоящему изобретению, в клетки-хозяин.

[0092] В некоторых вариантах осуществления способ редактирования целевой РНК включает введение множества РНК, рекрутирующих дезаминазу, или одной или более

конструкций, содержащих множество РНК, рекрутирующих дезаминазу, в клетки-хозяин для рекрутирования аденозиндезаминазы, действующей на РНК (ADAR), для проведения реакции дезаминирования на одном или более целевых аденозинах в одной или более целевых РНК, где каждая РНК, рекрутирующая дезаминазу, содержит последовательности РНК, комплементарные соответствующей целевой РНК.

[0093] В одном аспекте настоящее изобретение относится к способу создания одной или более модификаций целевой РНК и/или белка, кодируемого целевой РНК, в клетке-хозяин (например, эукариотической клетке), включающему введение dРНК или конструкции, кодирующей dРНК, в клетку-хозяин, где dРНК содержит комплементарную последовательность РНК, которая гибридизуется с целевой РНК, и где одна или более модификаций выбраны из группы, состоящей из точечной мутации белка, кодируемого целевой РНК, неправильной укладки белка, кодируемого целевой РНК, раннего стоп-кодона в целевой РНК, абберрантного сайта сплайсинга в целевой РНК и альтернативного сайта сплайсинга в целевой РНК.

[0094] В некоторых вариантах осуществления способ создания одной или более модификаций целевой РНК и/или белка, кодируемого целевой РНК, в клетках-хозяин (например, эукариотических клетках), включает введение множества рекрутирующих дезаминазу РНК или конструкций, кодирующих множество РНК, рекрутирующих дезаминазу, в клетки-хозяин, где каждая dРНК содержит комплементарную последовательность РНК, которая гибридизуется с соответствующей целевой РНК во множестве целевых РНК, и где каждая dРНК способна рекрутировать ADAR для дезаминирования целевого А в соответствующей целевой РНК.

[0095] В одном аспекте настоящее изобретение относится к применению РНК, рекрутирующей дезаминазу, в соответствии с любой из dРНК, описанных в данном документе, для редактирования целевой РНК в клетке-хозяин. В некоторых вариантах осуществления РНК, рекрутирующая дезаминазу, содержит комплементарную последовательность РНК, которая гибридизуется с целевой РНК, подлежащей редактированию.

[0096] В одном аспекте настоящее изобретение относится к применению РНК, рекрутирующей дезаминазу, в соответствии с любой из dРНК, описанных в данном документе, для создания одной или более модификаций целевой РНК и/или белка, кодируемого целевой РНК, где одна или более модификаций выбраны из группы, состоящей из точечной мутации белка, кодируемого целевой РНК, неправильной укладки белка, кодируемого целевой РНК, раннего стоп-кодона в целевой РНК, абберрантного сайта сплайсинга в целевой РНК и альтернативного сайта сплайсинга в целевой РНК. В

некоторых вариантах осуществления РНК, рекрутирующая дезаминазу, содержит комплементарную последовательность РНК, которая гибридизуется с целевой РНК, подлежащей редактированию.

[0097] Настоящее изобретение также относится к способу применения эндогенной аденозиндезаминазы для редактирования целевой РНК в эукариотической клетке, включающему введение dРНК или конструкции, кодирующей dРНК, как описано в настоящем документе, в эукариотическую клетку для рекрутирования естественной эндогенной аденозиндезаминазы, действующей на РНК (ADAR), для проведения реакции дезаминирования целевого аденозина в последовательности целевой РНК.

[0098] В некоторых вариантах осуществления по любому из способов или применений по настоящему изобретению, dРНК содержит по меньшей мере примерно 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240 или 250 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления dРНК имеет длину примерно от 40 до 260, от 45 до 250, от 50 до 240, от 60 до 230, от 65 до 220, от 70 до 210, от 70 до 200, от 70 до 190, от 70 до 180, от 70 до 170, от 70 до 160, от 70 до 150, от 70 до 140, от 70 до 130, от 70 до 120, от 70 до 110, от 70 до 100, от 70 до 90, от 70 до 80, от 75 до 200, от 80 до 190, от 85 до 180, от 90 до 170, 95 до 160, от 100 до 200, от 100 до 150, от 100 до 175, от 110 до 200, от 110 до 175, от 110 до 150 или от 105 до 140 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления dРНК имеет длину примерно от 60 до 200, например, примерно от 60 до 150, от 65 до 140, от 68 до 130 или от 70 до 120 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления dРНК имеет длину примерно 71 нуклеотид. В некоторых вариантах осуществления dРНК имеет длину примерно 111 нуклеотидов.

[0099] В некоторых вариантах осуществления по любому из способов или применений по настоящему изобретению, dРНК не содержит домен, рекрутирующий ADAR. "Домен, рекрутирующий ADAR" может представлять собой нуклеотидную последовательность или структуру, связывающуюся с высокой аффинностью с ADAR, или нуклеотидную последовательность, связывающуюся с партнером по связыванию, слитым с ADAR, в сконструированной конструкции ADAR. Иллюстративные домены, рекрутирующие ADAR, включают, но не ограничиваются ими, GluR-2, GluR-B (R/G), GluR-B (Q/R), GluR-6 (R/G), 5HT2C и FlnA (Q/R) домен, см., например, публикацию Wahlstedt, Helene, and Marie, "Site-selective versus promiscuous A-to-I editing." Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA 2.6 (2011): 761-771, содержание которой полностью включено в настоящий документ посредством ссылки. В некоторых вариантах осуществления dРНК не содержит двухцепочечной части. В некоторых вариантах осуществления dРНК не содержит шпильки, такой как структура "петля-на-стебле" MS2. В некоторых вариантах осуществления dРНК

является одноцепочечной. В некоторых вариантах осуществления dPHK не содержит DSB-связывающего домена. В некоторых вариантах осуществления dPHK состоит из (или по существу состоит из) комплементарной последовательности РНК.

[00100] В некоторых вариантах осуществления по любому из способов или применений по настоящему изобретению, dPHK не содержит химических модификаций. В некоторых вариантах осуществления dPHK не содержит химически модифицированного нуклеотида, такого как 2'-О-метилнуклеотид или нуклеотид, имеющий фосфоротиоатную связь. В некоторых вариантах осуществления dPHK содержит 2'-О-метилирование и фосфоротиоатную связь только в первых трех и последних трех остатках. В некоторых вариантах осуществления dPHK не является антисмысловым олигонуклеотидом (ASO).

[00101] В некоторых вариантах осуществления по любому из способов или применений по настоящему изобретению, клетка-хозяин представляет собой прокариотическую клетку. В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин представляет собой эукариотическую клетку. Предпочтительно клетка-хозяин представляет собой клетку млекопитающего. Наиболее предпочтительно клетка-хозяин представляет собой клетку человека. В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин представляет собой клетку мыши. В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин представляет собой растительную клетку или грибковую клетку.

[00102] В некоторых вариантах осуществления по любому из способов или применений по настоящему изобретению, клетка-хозяин представляет собой клеточную линию, такую как HEK293T, HT29, A549, HepG2, RD, SF268, SW13 и HeLa клетки. В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин представляет собой первичную клетку, такую как фибробластная, эпителиальная или иммунная клетка. В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин представляет собой Т-клетку. В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин представляет собой постмитотическую клетку. В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин представляет собой клетку центральной нервной системы (ЦНС), такую как клетка мозга, например, клетка мозжечка.

[00103] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способу редактирования целевой РНК в первичной клетке-хозяин (например, Т-клетке или клетке ЦНС), включающему введение dPHK или конструкции, кодирующей dPHK, в клетку-хозяин, где dPHK содержит комплементарную последовательность РНК, которая гибридизуется с целевой РНК, и где dPHK рекрутирует эндогенно экспрессируемый ADAR клетки-хозяина для дезаминирования целевого А в целевой РНК.

[00104] В некоторых вариантах осуществления по любому из способов или применений по настоящему изобретению, ADAR является эндогенным для клетки-хозяина.

В некоторых вариантах осуществления аденозиндезаминаза, действующая на РНК (ADAR), естественно или эндогенно присутствует в клетке-хозяин, например, естественно или эндогенно присутствует в эукариотической клетке. В некоторых вариантах осуществления ADAR эндогенно экспрессируется клеткой-хозяином. В некоторых вариантах осуществления ADAR экзогенно вводят в клетку-хозяина. В некоторых вариантах осуществления ADAR представляет собой ADAR1 и/или ADAR2. В некоторых вариантах осуществления ADAR представляет собой одну или более ADAR, выбранных из группы, состоящей из hADAR1, hADAR2, мышинных ADAR1 и ADAR2. В некоторых вариантах осуществления ADAR представляет собой ADAR1, такую как изоформа p110 ADAR1 ("ADAR1^{p110}") и/или изоформа p150 ADAR1 ("ADAR1^{p150}"). В некоторых вариантах осуществления ADAR представляет собой ADAR2. В некоторых вариантах осуществления ADAR представляет собой ADAR2, экспрессируемую клеткой-хозяином, например, ADAR2, экспрессируемую клетками мозжечка.

[00105] В некоторых вариантах осуществления ADAR представляет собой экзогенную ADAR для клетки-хозяина. В некоторых вариантах осуществления ADAR представляет собой гиперактивный мутант встречающейся в природе ADAR. В некоторых вариантах осуществления ADAR представляет собой ADAR1, содержащую мутацию E1008Q. В некоторых вариантах осуществления ADAR не является слитым белком, содержащим связывающий домен. В некоторых вариантах осуществления ADAR не содержит сконструированного двухцепочечного связывающего нуклеиновую кислоту домена. В некоторых вариантах осуществления ADAR не содержит домен MCP, который связывается со шпилькой MS2, которая слита с комплементарной последовательностью РНК в dРНК. В некоторых вариантах осуществления ADAR не содержит DSB.

[00106] В некоторых вариантах осуществления по любому из способов или применений по настоящему изобретению, клетка-хозяин имеет высокий уровень экспрессии ADAR1 (такого как ADAR1^{p110} и/или ADAR1^{p150}), например, по меньшей мере примерно 10 %, 20 %, 50 %, 100 %, 2×, 3×, 5× или более относительно уровня экспрессии белка β-тубулина. В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин имеет высокий уровень экспрессии ADAR2, например, по меньшей мере примерно 10 %, 20 %, 50 %, 100 %, 2×, 3×, 5× или более по сравнению с уровнем экспрессии белка β-тубулина. В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин имеет низкий уровень экспрессии ADAR3, например, не более примерно 5×, 3×, 2×, 100 %, 50 %, 20 % или менее относительно уровня экспрессии белка β-тубулина.

[00107] В некоторых вариантах осуществления по любому из способов или применений по настоящему изобретению, комплементарная последовательность РНК

содержит цитидин, аденозин или уридин, прямо противоположный целевому А в целевой РНК. В некоторых вариантах осуществления комплементарная последовательность РНК содержит ошибку спаривания цитидина, прямо противоположного целевому А в целевой РНК. В некоторых вариантах осуществления ошибка спаривания цитидина расположена по меньшей мере на 5 нуклеотидов, например, по меньшей мере на 10, 15, 20, 25, 30 или более нуклеотидов от 5'-конца комплементарной последовательности РНК. В некоторых вариантах осуществления ошибка спаривания цитидина расположена по меньшей мере на 20 нуклеотидов, например, по меньшей мере на 25, 30, 35 или более нуклеотидов, от 3'-конца комплементарной последовательности РНК. В некоторых вариантах осуществления ошибка спаривания цитидина не расположена в пределах 20 (например, 15, 10, 5 или менее) нуклеотидов от 3'-конца комплементарной последовательности РНК. В некоторых вариантах осуществления ошибка спаривания цитидина расположена по меньшей мере на 20 нуклеотидов (например, по меньшей мере на 25, 30, 35 или более нуклеотидов) от 3'-конца и по меньшей мере на 5 нуклеотидов (например, по меньшей мере 10, 15, 20, 25, 30 или более нуклеотидов) от 5'-конца комплементарной последовательности РНК. В некоторых вариантах осуществления ошибка спаривания цитидина расположена в центре комплементарной последовательности РНК. В некоторых вариантах осуществления ошибка спаривания цитидина расположена в пределах 20 нуклеотидов (например, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 нуклеотида) от центра комплементарной последовательности в dРНК.

[00108] dРНК по настоящему изобретению также может быть охарактеризована как содержащая от 5'-конца до 3'-конца: 5'-участок, ошибку спаривания цитидина, прямо противоположного целевому А в целевой РНК, и 3'-участок. В некоторых вариантах осуществления 3'-участок не короче примерно 7 нт (например, не короче 8 нт, не короче 9 нт и не короче 10 нт) нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления 3'-участок имеет длину примерно от 7 до 25 нт нуклеотидов (например, длину примерно от 10 до 15 нт или от 21 до 25 нт нуклеотидов). В некоторых вариантах осуществления 5'-участок не короче примерно 25 (например, не короче примерно 30 нт, не короче примерно 35 нт, не короче примерно 40 нт и не короче примерно 45 нт) нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления 5'-участок имеет длину примерно от 25 до 85 нт нуклеотидов (например, длину примерно от 25 до 80 нт, от 25 до 75 нт, от 25 до 70 нт, от 25 до 65 нт, от 25 до 60 нт, от 30 до 55 нт, от 40 до 55 нт или от 45 до 55 нт нуклеотидов). В некоторых вариантах осуществления 5'-участок имеет длину примерно от 25 до 85 нт нуклеотидов (например, длину примерно от 25 до 80 нт, от 25 до 75 нт, от 25 до 70 нт, от 25 до 65 нт, от 25 до 60 нт, от 30 до 55 нт, от 40 до 55 нт или от 45 до 55 нт нуклеотидов), и 3'-участок имеет длину примерно от 7 до 25 нт нуклеотидов (например, длину примерно от 10 до 15 нт или от 21

до 25 нт нуклеотидов). В некоторых вариантах осуществления 5'-участок длиннее 3' участка. В некоторых вариантах осуществления 5'-участок имеет длину примерно 55 нуклеотидов, а 3'-участок имеет длину примерно 15 нуклеотидов.

[00109] В некоторых вариантах осуществления положение ошибки спаривания цитидина в dРНК соответствует любой из dРНК, описанных в примерах в настоящем документе, и dРНК может быть, например, в формате Xнт-с-Yнт, где X представляет собой длину 5'-участка, и Y представляет собой длину 3'-участка: 55нт-с-35нт, 55нт-с-25нт, 55нт-с-24нт, 55нт-с-23нт, 55нт-с-22нт, 55нт-с-21нт, 55нт-с-20нт, 55нт-с-19нт, 55нт-с-18нт, 55нт-с-17нт, 55нт-с-16нт, 55нт-с-15нт, 55нт-с-14нт, 55нт-с-13нт, 55нт-с-12нт, 55нт-с-11нт, 55нт-с-10нт, 55нт-с-9нт, 55нт-с-8нт, 55нт-с-7нт, 55нт-н-20нт, 50нт-н-20нт, 45нт-н-20нт, 55нт-н-15нт, 50нт-н-15нт, 45нт-с-45нт, 45нт-с-55нт, 54нт-с-12нт, 53нт-с-13нт, 52нт-с-14нт, 51нт-с-15нт, 50нт-с-16нт, 49нт-с-17нт, 48нт-с-18нт, 47нт-с-19нт, 46нт-с-20нт, 45нт-с-21нт, 44нт-с-22нт, 43нт-с-23нт, 54нт-с-15нт, 53нт-с-16нт, 52нт-с-17нт, 51нт-с-18нт, 50нт-с-19нт, 49нт-с-20нт, 48нт-с-21нт, 47нт-с-22нт, 46нт-с-23нт, 54нт-с-17нт, 53нт-н-18нт, 52нт-н-19нт, 51нт-н-20нт, 50нт-н-21нт, 49нт-н-22нт, 48нт-с-23нт.

[00110] В некоторых вариантах осуществления по любому из способов или применений по настоящему изобретению, комплементарная последовательность РНК дополнительно содержит один или более гуанозинов, например, 1, 2, 3, 4, 5, 6 или более G, каждый из которых прямо противоположен нецелевому аденозину в целевой РНК. В некоторых вариантах осуществления комплементарная последовательность РНК содержит два или более последовательных ошибки спаривания нуклеотида (например, 2, 3, 4, 5 или более ошибки спаривания нуклеотида), противоположных нецелевому аденозину в целевой РНК. В некоторых вариантах осуществления целевая РНК содержит не более примерно 20 нецелевых A, например, не более примерно 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 нецелевых A. G и последовательные ошибки спаривания нуклеотидов, противоположные нецелевым A, могут уменьшить нецелевые эффекты редактирования с помощью ADAR.

[00111] В некоторых вариантах осуществления по любому из способов или применений по настоящему изобретению, 5' ближайший сосед целевого A представляет собой нуклеотид, выбранный из U, C, A и G, предпочтительно $U > C \approx A > G$, и 3' ближайший сосед целевого A представляет собой нуклеотид, выбранный из G, C, A и U, предпочтительно $G > C > A \approx U$. В некоторых вариантах осуществления целевой A находится в мотиве из трех оснований, выбранном из группы, состоящей из UAG, UAC, UAA, UAU, CAG, CAC, CAA, CAU, AAG, AAC, AAA, AAU, GAG, GAC, GAA и GAU в целевой РНК. В некоторых вариантах осуществления мотив из трех оснований представляет собой UAG, а dРНК содержит A, прямо противоположный U в мотиве из трех

оснований, С, прямо противоположный целевому А, и С, G или U, прямо противоположный G в мотиве из трех оснований. В некоторых вариантах осуществления мотив из трех оснований представляет собой UAG в целевой РНК, а dРНК содержит ACC, ACG или ACU, прямо противоположный UAG целевой РНК. В некоторых вариантах осуществления мотив из трех оснований представляет собой UAG в целевой РНК, а dРНК содержит ACC, прямо противоположный UAG целевой РНК.

[00112] В некоторых вариантах осуществления dРНК содержит одну или более модификаций. Примеры модификаций dРНК включают, но не ограничиваются ими, модификацию фосфоротиоатного каркаса, 2'-замены в рибозе (такие как 2'-О-метилирование и 2'-фтор замены), LNA и L-РНК. В некоторых вариантах осуществления dРНК содержит одну или более модификаций, таких как 2'-О-метилирование и/или фосфоротиоат. В некоторых вариантах осуществления dРНК имеет длину примерно от 60 до 200 (данный диапазон охватывает любые последовательные положительные целые числа между числами 60 и 200, например, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 115, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200) нуклеотидов и содержит одну или более модификаций (таких как 2'-О-метилирование и/или 3'-фосфоротиоат). В некоторых вариантах осуществления dРНК имеет длину примерно от 60 до 200 нуклеотидов и содержит одну или более модификаций. В некоторых вариантах осуществления dРНК имеет длину примерно от 60 до 200 нуклеотидов и содержит модификации 2'-О-метилирование и/или фосфоротиоат. В некоторых вариантах осуществления dРНК содержит 2'-О-метилирования в первых и последних 3 нуклеотидах и/или фосфоротиоаты в первых и последних 3 межнуклеотидных связях. В некоторых вариантах осуществления dРНК содержит 2'-О-метилирования в первых и последних 3 нуклеотидах, фосфоротиоат в первых и последних 3 межнуклеотидных связях и 2'-О-метилирование в одном или более уридинах, например, во всех уридинах. В некоторых вариантах осуществления dРНК содержит 2'-О-метилирования в первых и последних 3 нуклеотидах, фосфоротиоаты в первых и последних 3 межнуклеотидных связях, 2'-О-метилирования в одном, или более, или всех уридинах и модификацию в нуклеотиде, противоположном целевому аденозину, и/или одном или двух нуклеотидах, ближайших к нуклеотиду, противоположному целевому аденозину. В некоторых вариантах осуществления модификация нуклеотида, противоположного целевому аденозину, и/или одного или двух нуклеотидов, ближайших к нуклеотиду, противоположному целевому аденозину, представляет собой 2'-О-метилирование. В некоторых вариантах осуществления модификация нуклеотида, противоположного целевому аденозину, и/или одного или двух нуклеотидов, ближайших к нуклеотиду, противоположному целевому аденозину, представляет собой фосфоротиоатную связь,

такую как 3'-фосфоротиоатная связь. В некоторых вариантах осуществления dPHK содержит 2'-О-метиличирования в первых и последних 3 нуклеотидах, фосфоротиоаты в первых и последних 3 межнуклеотидных связях, 2'-О-метиличирования во всех уридинах и 2'-О-метиличирование в нуклеотиде, прилегающем к 3'-концу и/или 5'-концу нуклеотида, противоположного целевому аденозину. В некоторых вариантах осуществления dPHK содержит 2'-О-метиличирования в первых и последних 3 нуклеотидах, фосфоротиоаты в первых и последних 3 межнуклеотидных связях, 2'-О-метиличирования в одном, или более, или всех уридинах и фосфоротиоатную связь, такую как 3'-фосфоротиоатная связь, в нуклеотиде, противоположном целевому аденозину и/или его 5'- и/или 3'-ближайших соседних нуклеотидах. В некоторых вариантах осуществления dPHK содержит 2'-О-метиличирования в первых и последних 5 нуклеотидах и фосфоротиоаты в первых и последних 5 межнуклеотидных связях.

[00113] В некоторых вариантах осуществления по любому из способов или применений по настоящему изобретению, целевая РНК представляет собой любую РНК, выбранную из группы, состоящей из предшественника мРНК, матричной РНК, рибосомальной РНК, транспортной РНК, длинной некодирующей РНК и малой РНК (например, микроРНК). В некоторых вариантах осуществления целевая РНК представляет собой предшественник мРНК. В некоторых вариантах осуществления целевая РНК представляет собой матричную РНК.

[00114] В некоторых вариантах осуществления по любому из способов или применений по настоящему изобретению, способ дополнительно включает введение ингибитора ADAR3 в клетку-хозяин. В некоторых вариантах осуществления ингибитор ADAR3 представляет собой РНКи против ADAR3, например, кшРНК против ADAR3 или миРНК против ADAR3. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает введение стимулятора интерферона в клетку-хозяин. В некоторых вариантах осуществления ADAR индуцируется интерфероном, например, ADAR представляет собой ADAR^{P150}. В некоторых вариантах осуществления стимулятор интерферона представляет собой IFN α . В некоторых вариантах осуществления ингибитор ADAR3 и/или стимулятор интерферона кодируются той же конструкцией (например, вектором), которая кодирует dPHK.

[00115] В некоторых вариантах осуществления по любому из способов или применений по настоящему изобретению, эффективность редактирования целевой РНК составляет по меньшей мере примерно 20 %, например, по меньшей мере примерно 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 % или выше. В некоторых вариантах осуществления эффективность редактирования определяется

секвенированием по Сэнгеру. В некоторых вариантах осуществления эффективность редактирования определяется секвенированием следующего поколения.

[00116] В некоторых вариантах осуществления по любому из способов или применений по настоящему изобретению, способ имеет низкую скорость нецелевого редактирования. В некоторых вариантах осуществления способ имеет эффективность редактирования нецелевого А в целевой РНК менее примерно 1 % (например, не более чем примерно 0,5 %, 0,1 %, 0,05 %, 0,01 %, 0,001 % или ниже). В некоторых вариантах осуществления способ не приводит к редактированию нецелевых А в целевой РНК. В некоторых вариантах осуществления способ имеет эффективность редактирования А в нецелевой РНК ниже примерно 0,1 % (например, не более примерно 0,05 %, 0,01 %, 0,005 %, 0,001 %, 0,0001 % или ниже).

[00117] В некоторых вариантах осуществления по любому из способов или применений по настоящему изобретению, способ не вызывает иммунного ответа, такого как врожденный иммунный ответ. В некоторых вариантах осуществления способ не индуцирует экспрессию интерферона и/или интерлейкина в клетке-хозяине. В некоторых вариантах осуществления способ не индуцирует экспрессию IFN- β и/или IL-6 в клетке-хозяине.

[00118] Также настоящее изобретение относится к отредактированной РНК или клеткам-хозяевам, имеющим отредактированную РНК, полученную любым из описанных в настоящем документе способов. В некоторых вариантах осуществления отредактированная РНК содержит инозин. В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин содержит РНК, имеющую миссенс-мутацию, ранний стоп-кодон, альтернативный сайт сплайсинга или aberrantный сайт сплайсинга. В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин содержит мутантный, усеченный или неправильно уложенный белок.

[00119] "Клетка-хозяин" по настоящему изобретению относится к любому типу клеток, который можно применять в качестве клетки-хозяина, при условии, что ее можно модифицировать, как описано в данном документе. Например, клетка-хозяин может быть клеткой-хозяин с эндогенно экспрессируемой аденозиндезаминазой, действующей на РНК (ADAR), или может быть клеткой-хозяин, где аденозиндезаминазу, действующую на РНК (ADAR), вводят известным в данной области техники способом. Например, клетка-хозяин может представлять собой прокариотическую клетку, эукариотическую клетку или растительную клетку. В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин происходит из предварительно установленной клеточной линии, такой как клеточные линии млекопитающих, включая клеточные линии человека или клеточные линии, не относящиеся к человеку. В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин происходит

от индивидуума, например, от человека.

[00120] В контексте настоящего документа термины "ввод" или "введение" означают доставку одного или более полинуклеотидов, таких как dРНК или одной или более конструкций, включая описанные в настоящем документе векторы, одного или более их транскриптов в клетку-хозяин. Настоящее изобретение служит базовой платформой для обеспечения возможности целевого редактирования РНК, например, предшественника мРНК, матричной РНК, рибосомной РНК, транспортной РНК, длинной некодирующей РНК и малой РНК (например, микроРНК). В способах по настоящему изобретению можно применять множество систем доставки, включая, но не ограничиваясь ими, вирусную, липосомную, электропорацию, микроинъекцию и конъюгацию, с целью введения dРНК или конструкции по настоящему изобретению в клетку-хозяин. Для введения нуклеиновых кислот в клетки млекопитающих или ткани-мишени можно применять обычные способы переноса генов на вирусной и невирусной основе. Такие способы можно применять для введения нуклеиновых кислот, кодирующих dРНК по настоящему изобретению, в клетки в культуре или в организме-хозяине. Системы доставки невирусных векторов включают плазмиды ДНК, РНК (например, транскрипт конструкции, описанной в настоящем документе), голую нуклеиновую кислоту и нуклеиновую кислоту в комплексе с носителем для доставки, таким как липосома. Системы доставки вирусных векторов включают ДНК и РНК вирусов, которые имеют либо эписомальные, либо интегрированные геномы для доставки в клетку-хозяин.

[00121] Способы невирусной доставки нуклеиновых кислот включают липофекцию, нуклеофекцию, микроинъекцию, биолистику, виросомы, липосомы, иммунолипосомы, поликатион или липид: конъюгаты нуклеиновых кислот, электропорацию, наночастицы, экзосомы, микровезикулы или генную пушку, голую ДНК и искусственные вирионы.

[00122] Применение систем на основе РНК или ДНК-вирусов для доставки нуклеиновых кислот имеет высокую эффективность при нацеливании вируса на конкретные клетки и транспортировке вирусной полезной нагрузки к клеточным ядрам.

[00123] В некоторых вариантах осуществления по любому из способов или применений по настоящему изобретению, способ включает введение вирусного вектора (такого как лентивирусный вектор), кодирующего dРНК, в клетку-хозяин. В некоторых вариантах осуществления способ включает введение плазмиды, кодирующей dРНК, в клетку-хозяин. В некоторых вариантах осуществления способ включает введение (например, электропорацией) dРНК (например, синтетической dРНК) в клетку-хозяин. В некоторых вариантах осуществления способ включает трансфекцию dРНК в клетку-хозяин.

[00124] После дезаминирования модификация целевой РНК и/или белка,

кодируемого целевой РНК, можно определить с применением различных способов в зависимости от положений целевых аденозинов в целевой РНК. Например, чтобы определить, был ли "А" отредактирован в "Г" в целевой РНК, для обнаружения модификации последовательности РНК можно применять способы секвенирования РНК, известные в данной области техники. Когда целевой аденозин расположен в кодирующей области мРНК, редактирование РНК может вызвать изменения аминокислотной последовательности, кодируемой мРНК. Например, точечные мутации могут быть введены в мРНК врожденной или приобретенной точечной мутации в мРНК, могут быть обращены с получением продукта(ов) гена дикого типа из-за преобразования "А" в "Г". Аминокислотное секвенирование способами, известными в данной области техники, можно применять для обнаружения любых изменений аминокислотных остатков в кодируемом белке. Модификации стоп-кодона могут быть определены путем оценки присутствия функционального, удлиненного, усеченного, полноразмерного белка и/или белка дикого типа. Например, когда целевой аденозин расположен в стоп-кодоне UGA, UAG или UAA, модификация целевого А (UGA или UAG) или нескольких А (UAA) может создать сквозную мутацию и/или удлиненный белок, или усеченный белок, кодируемый целевой РНК, может быть обращен для создания функционального, полноразмерного белка и/или белка дикого типа. Редактирование целевой РНК может также генерировать аберрантный сайт сплайсинга и/или альтернативный сайт сплайсинга в целевой РНК, таким образом, приводя к удлиненному, усеченному или неправильно уложенному белку, или аберрантный сайт сплайсинга или альтернативный сайт сплайсинга, кодируемый в целевой РНК, изменяемый, может быть обращен для создания функционального, правильно уложенного, полноразмерного белка и/или белка дикого типа. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение обеспечивает редактирование как врожденных, так и приобретенных генетических изменений, например, миссенс-мутации, раннего стоп-кодона, аберрантного сайта сплайсинга или альтернативного сайта сплайсинга, кодируемого целевой РНК. Применяя известные способы для оценки функции белка, кодируемого целевой РНК, можно выяснить, достигает ли редактирование РНК желаемых эффектов. Поскольку дезаминирование аденозина (А) до инозина (Г) может исправить мутированный А в целевом положении в мутантной РНК, кодирующей белок, идентификация дезаминирования в инозин может дать оценку того, присутствует ли функциональный белок, или РНК, связанная с заболеванием или устойчивостью к лекарственному средству, вызванная присутствием мутировавшего аденозина, обращена или частично обращена. Точно так же, поскольку дезаминирование аденозина (А) до инозина (Г) может вызвать точечную мутацию в полученном белке, идентификация

дезаминирования в инозин может служить функциональным показателем для идентификации причины заболевания или соответствующего фактора заболевания.

[00125] Когда присутствие целевого аденозина вызывает аберрантный сплайсинг, считывание может быть оценкой возникновения и частоты аберрантного сплайсинга. С другой стороны, когда дезаминирование целевого аденозина желательно для введения сайта сплайсинга, можно применять аналогичные подходы для проверки того, происходит ли требуемый тип сплайсинга. Примером подходящего способа для идентификации присутствия инозина после дезаминирования целевого аденозина является способ ПЦР с обратной транскрипцией и секвенирование с применением способов, которые хорошо известны специалисту в данной области техники.

[00126] Эффекты дезаминирования целевого аденозина включают, например, точечную мутацию, ранний стоп-кодон, аберрантный сайт сплайсинга, альтернативный сайт сплайсинга и неправильную укладку полученного белка. Такие эффекты могут вызывать структурные и функциональные изменения РНК и/или белков, связанных с заболеваниями, независимо от того, наследуются ли они генетически или вызваны приобретенными генетическими мутациями, или могут вызывать структурные и функциональные изменения РНК и/или белков, связанных с возникновением устойчивости к лекарственным средствам. Следовательно, dРНК, конструкции, кодирующие dРНК, и способы редактирования РНК по настоящему изобретению можно применять для профилактики или лечения наследственных генетических заболеваний или состояний, или заболеваний или состояний, связанных с приобретенными генетическими мутациями, путем изменения структуры и/или функции связанных с заболеванием РНК и/или белков.

[00127] В некоторых вариантах осуществления целевая РНК представляет собой регуляторную РНК. В некоторых вариантах осуществления целевая РНК, подлежащая редактированию, представляет собой рибосомную РНК, транспортную РНК, длинную некодирующую РНК или малую РНК (например, микроРНК, прай-миРНК, пре-миРНК, рiРНК, миРНК, мноРНК, мяРНК, внеклеточная РНК или малые РНК, специфичные для телец Кахаля). Эффекты дезаминирования целевых аденозинов включают, например, структурные и функциональные изменения рибосомной РНК, транспортной РНК, длинной некодирующей РНК или малой РНК (например, микроРНК), включая изменения трехмерной структуры и/или потерю функции или усиление функции целевой РНК. В некоторых вариантах осуществления дезаминирование целевых А в целевой РНК изменяет уровень экспрессии одной или более последующих молекул (например, белка, РНК и/или метаболитов) целевой РНК. Изменения уровня экспрессии последующих молекул могут выражаться в повышении или понижении уровня экспрессии.

[00128] Некоторые варианты осуществления настоящего изобретения включают мультиплексное редактирование целевых РНК в клетках-хозяевах, пригодных для скрининга различных вариантов целевого гена или разных генов в клетках-хозяевах. В некоторых вариантах осуществления, где способ включает введение множества dРНК в клетки-хозяева, по меньшей мере две dРНК из множества dРНК имеют разные последовательности и/или имеют разные целевые РНК. В некоторых вариантах осуществления каждая dРНК имеет различную последовательность и/или различную целевую РНК. В некоторых вариантах осуществления способ приводит к образованию множества (например, по меньшей мере 2, 3, 5, 10, 50, 100, 1000 или более) модификаций одной целевой РНК в клетках-хозяевах. В некоторых вариантах осуществления способ приводит к образованию модификации в множестве (например, по меньшей мере 2, 3, 5, 10, 50, 100, 1000 или более) целевых РНК в клетках-хозяевах. В некоторых вариантах осуществления способ включает редактирование множества целевых РНК во множестве популяций клеток-хозяев. В некоторых вариантах осуществления каждая популяция клеток-хозяев получает различную dРНК или dРНК, имеющих целевую РНК отличную от других популяций клеток-хозяев.

[00129] РНК, рекрутирующая дезаминазу, конструкция и библиотека

[00130] В одном аспекте настоящее изобретение обеспечивает РНК, рекрутирующую дезаминазу, пригодную для любого из описанных в настоящем документе способов. Любую из dРНК по настоящему изобретению можно применять в способах редактирования и лечения РНК, описанных в настоящем документе. Предполагается, что любые признаки и параметры, описанные в данном документе для dРНК, можно комбинировать друг с другом, как если бы каждую комбинацию описывали индивидуально. Описанные в настоящем документе dРНК не содержат tracrРНК, crРНК или gРНК, применяемые в системе CRISPR/Cas.

[00131] В некоторых вариантах осуществления обеспечена РНК, рекрутирующая дезаминазу (dРНК), для дезаминирования целевого аденозина в целевой РНК путем рекрутирования ADAR, содержащего комплементарную последовательность РНК, которая гибридизуется с целевой РНК.

[00132] В одном аспекте настоящее изобретение относится к конструкции, содержащей любую из описанных в настоящем документе РНК, рекрутирующих дезаминазу. В некоторых вариантах осуществления конструкция представляет собой вирусный вектор (предпочтительно лентивирусный вектор) или плазмиду. В некоторых вариантах осуществления конструкция кодирует одну dРНК. В некоторых вариантах осуществления конструкция кодирует множество (например, примерно любую из 1, 2, 3, 4,

5, 10, 20 или более) dРНК.

[00133] В одном аспекте настоящее изобретение относится к библиотеке, содержащей множество РНК, рекрутирующих дезаминазу, или множество описанных в настоящем документе конструкций.

[00134] В одном аспекте настоящее изобретение относится к композиции или клетке-хозяин, содержащей РНК, рекрутирующую дезаминазу, или конструкцию, описанную в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин представляет собой прокариотическую клетку или эукариотическую клетку. Предпочтительно клетка-хозяин представляет собой клетку млекопитающего. Наиболее предпочтительно клетка-хозяин представляет собой клетку человека.

[00135] В некоторых вариантах осуществления в соответствии с любой из dРНК, конструкций, библиотек или композиций, описанных в настоящем документе, комплементарная последовательность РНК содержит цитидин, аденозин или уридин, прямо противоположный целевому аденозину, подлежащему редактированию, в целевой РНК. В некоторых вариантах осуществления комплементарная последовательность РНК дополнительно содержит один или более гуанозинов, каждый из которых прямо противоположен нецелевому аденозину в целевой РНК. В некоторых вариантах осуществления 5' ближайший сосед целевого А представляет собой нуклеотид, выбранный из U, C, A и G, предпочтительно $U > C \approx A > G$, а 3' ближайший сосед целевого А представляет собой нуклеотид, выбранный из G, C, A и U, предпочтительно $G > C > A \approx U$. В некоторых вариантах осуществления 5' ближайший сосед целевого А представляет собой U. В некоторых вариантах осуществления 5' ближайший сосед целевого А представляет собой C или A. В некоторых вариантах осуществления 3' ближайший сосед целевого А представляет собой G. В некоторых вариантах осуществления 3' ближайший сосед целевого А представляет собой C.

[00136] В некоторых вариантах осуществления в соответствии с любой из dРНК, конструкций, библиотек или композиций, описанных в настоящем документе, целевой А находится в мотиве из трех оснований, выбранном из группы, состоящей из UAG, UAC, UAA, UAU, CAG, CAC, CAA, CAU, AAG, AAC, AAA, AAU, GAG, GAC, GAA и GAU в целевой РНК. В некоторых вариантах осуществления мотив из трех оснований представляет собой UAG, а dРНК содержит А, прямо противоположный U в мотиве из трех оснований, C, прямо противоположный целевому А, и C, G или U, прямо противоположный G в мотиве из трех оснований. В некоторых вариантах осуществления мотив из трех оснований представляет собой UAG в целевой РНК, а dРНК содержит ACC, ACG или ACU, прямо противоположный UAG целевой РНК.

[00137] В некоторых вариантах осуществления dРНК содержит ошибку спаривания цитидина, прямо противоположного целевому А в целевой РНК. В некоторых вариантах осуществления ошибка спаривания цитидина расположена близко к центру комплементарной последовательности РНК, например, в пределах 20, 15, 10, 5, 4, 3, 2 или 1 нуклеотида от центра комплементарной последовательности РНК. В некоторых вариантах осуществления ошибка спаривания цитидина расположена по меньшей мере на 5 нуклеотидов от 5'-конца комплементарной последовательности РНК. В некоторых вариантах осуществления ошибка спаривания цитидина расположена по меньшей мере на 20 нуклеотидов от 3'-конца комплементарной последовательности РНК.

[00138] В некоторых вариантах осуществления в соответствии с любой из dРНК, конструкций, библиотек или композиций, описанных в настоящем документе, dРНК содержит по меньшей мере примерно 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240 или 250 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления dРНК имеет длину примерно от 40 до 260, от 45 до 250, от 50 до 240, от 60 до 230, от 65 до 220, от 70 до 210, от 70 до 200, от 70 до 190, от 70 до 180, от 70 до 170, от 70 до 160, от 70 до 150, от 70 до 140, от 70 до 130, от 70 до 120, от 70 до 110, от 70 до 100, от 70 до 90, от 70 до 80, от 75 до 200, от 80 до 190, от 85 до 180, от 90 до 170, от 95 до 160, от 100 до 150 или от 105 до 140 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления dРНК имеет длину примерно от 60 до 200 (например, примерно от 60 до 150, от 65 до 140, от 68 до 130 или от 70 до 120) нуклеотидов.

[00139] dРНК по настоящему изобретению содержит комплементарную последовательность РНК, которая гибридизуется с целевой РНК. Комплементарная последовательность РНК полностью комплементарна или по существу комплементарна целевой РНК, что позволяет гибридизовать комплементарную последовательность РНК с целевой РНК. В некоторых вариантах осуществления комплементарная последовательность РНК имеет 100% комплементарность последовательности в качестве целевой РНК. В некоторых вариантах осуществления комплементарная последовательность РНК по меньшей мере примерно на 70 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % или 99 % или более комплементарна на непрерывном участке по меньшей мере примерно 20, 40, 60, 80, 100, 150, 200 или более нуклеотидов в целевой РНК. В некоторых вариантах осуществления дцРНК, образованная гибридизацией между комплементарной последовательностью РНК и целевой РНК, имеет одну или более (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более) пар оснований не по Уотсону-Крику (т.е. ошибки спаривания).

[00140] ADAR, например, человеческие ферменты ADAR редактируют структуры

двухцепочечной РНК (дцРНК) с различной специфичностью, в зависимости от ряда факторов. Одним из важных факторов является степень комплементарности двух цепей, составляющих последовательность дцРНК. Полная комплементарность между дРНК и целевой РНК обычно заставляет каталитический домен ADAR дезаминировать аденозины неселективным образом. Специфичность и эффективность ADAR можно изменить путем введения ошибок спаривания в область дцРНК. Например, ошибка спаривания А-С предпочтительно рекомендуется для повышения специфичности и эффективности дезаминирования аденозина, подлежащего редактированию. И наоборот, в других положениях А (аденозин), кроме целевого А (то есть "нецелевого А"), ошибка спаривания G-A может уменьшить нецелевое редактирование. Полная комплементарность не обязательно требуется для образования дцРНК между дРНК и ее целевой РНК, при условии, что присутствует существенная комплементарность для гибридизации и образования дцРНК между дРНК и целевой РНК. В некоторых вариантах осуществления последовательность дРНК или ее область одноцепочечной РНК имеет по меньшей мере примерно 70 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % или 99 % комплементарности последовательности целевой РНК при оптимальном выравнивании. Оптимальное выравнивание может быть определено с применением любого подходящего алгоритма выравнивания последовательностей, неограничивающие примеры которого включают алгоритм Смита-Уотермана, алгоритм Нидлмана-Вимша, алгоритмы, основанные на преобразовании Барроуза-Уилера (например, выравниватель Барроуза-Уилера).

[00141] Нуклеотиды, соседствующие с целевым аденозином, также влияют на специфичность и эффективность дезаминирования. Например, 5' ближайший сосед целевого аденозина, подлежащего редактированию в последовательности целевой РНК, имеет предпочтение $U > C \approx A > G$, а 3' ближайший сосед целевого аденозина, подлежащего редактированию в последовательности целевой РНК, имеет предпочтение $G > C > A \approx U$ с точки зрения специфичности и эффективности дезаминирования аденозина. В некоторых вариантах осуществления, когда целевой аденозин может находиться в мотиве из трех оснований, выбранном из группы, состоящей из UAG, UAC, UAA, UAU, CAG, CAC, CAA, CAU, AAG, AAC, AAA, AAU, GAG, GAC, GAA и GAU в целевой РНК, специфичность и эффективность дезаминирования аденозина выше, чем аденозинов в других мотивах из трех оснований. В некоторых вариантах осуществления, когда целевой аденозин, подлежащий редактированию, находится в мотиве из трех оснований UAG, UAC, UAA, UAU, CAG, CAC, AAG, AAC или AAA, эффективность дезаминирования аденозина намного выше, чем аденозинов в других мотивах. Что касается одного и того же мотива из трех оснований, разные конструкции дРНК также могут приводить к разной эффективности

дезаминирования. Если взять в качестве примера мотив из трех оснований UAG, в некоторых вариантах осуществления, когда dРНК содержит цитидин (C), прямо противоположный целевому аденозину, подлежащему редактированию, аденозин (A), прямо противоположный уридину, и цитидин (C), гуанозин (G) или уридин (U), прямо противоположный гуанозину, эффективность деаминации целевого аденозина выше, чем при применении других последовательностей dРНК. В некоторых вариантах осуществления, когда dРНК содержит ACC, ACG или ACU, противоположный UAG целевой РНК, эффективность редактирования А в UAG целевой РНК может достигать примерно от 25 до 30 %.

[00142] Помимо целевых аденозинов, в целевой РНК может быть один или более аденозинов, редактирование которых нежелательно. Для таких аденозинов, предпочтительно, насколько это возможно, снизить эффективность их редактирования. С помощью настоящего изобретения обнаружено, что там, где гуанозин прямо противоположен аденозину в целевой РНК, эффективность деаминации значительно снижается. Следовательно, чтобы уменьшить нецелевое деаминарование, dРНК могут быть сконструированы так, чтобы содержать один или более гуанозинов, прямо противоположных одному или более аденозинам, отличным от целевого аденозина, подлежащего редактированию в целевой РНК.

[00143] Желаемый уровень специфичности и эффективности редактирования последовательности целевой РНК может зависеть от различных приложений. Следуя инструкциям в настоящей заявке, специалисты в данной области техники будут способны сконструировать dРНК, имеющую комплементарную или по существу комплементарную последовательность последовательности целевой РНК, в соответствии со своими потребностями, и с помощью некоторых проб и ошибок получить желаемые результаты. В контексте настоящего документа термин "ошибка спаривания" относится к противоположным нуклеотидам в двухцепочечной РНК (дцРНК), которые не образуют идеальных пар оснований в соответствии с правилами спаривания оснований по Уотсону-Крику. Ошибочно спаренные пары оснований включают, например, пары оснований G-A, C-A, U-C, A-A, G-G, C-C, U-U. Взяв в качестве примера спаривание А-С, где целевой А должен быть отредактирован в целевой РНК, dРНК разработана так, чтобы содержать С, противоположный А, подлежащему редактированию, создавая ошибку спаривания А-С в дцРНК, образованной гибридизацией между целевой РНК и dРНК.

[00144] В некоторых вариантах осуществления дцРНК, образованная гибридизацией между dРНК и целевой РНК, не содержит ошибки спаривания. В некоторых вариантах осуществления дцРНК, образованная гибридизацией между dРНК и целевой РНК,

содержит одну или более, например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или более ошибок спаривания (например, один и тот же тип разных типов ошибок спаривания). В некоторых вариантах осуществления дцРНК, образованная гибридизацией между дРНК и целевой РНК, содержит один или более видов ошибок спаривания, например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 видов ошибок спаривания, выбранных из группы, состоящей из G-A, C-A, U-C, A-A, G-G, C-C и U-U.

[00145] Нуклеотиды с ошибкой спаривания в дцРНК, образованные гибридизацией между дРНК и целевой РНК, могут образовывать выпетливания, которые могут способствовать эффективности редактирования целевой РНК. Может быть одно (образующееся только в целевом аденозине) или более выпетливаний, образованных ошибками спаривания. Дополнительные ошибки спаривания, вызывающие выпетливание, могут располагаться выше и/или ниже целевого аденозина. Выпетливания могут представлять собой выпетливания с одной ошибкой спаривания (вызванными одной ошибочно спаренной парой оснований) или выпетливания с множеством ошибок спаривания (вызванными более чем одной последовательной ошибочно спаренной парой оснований, предпочтительно двумя или тремя последовательными ошибочно спаренными парами оснований).

[00146] Комплементарная последовательность РНК в дРНК является одноцепочечной. дРНК может быть полностью одноцепочечной или иметь одну или более (например, 1, 2, 3 или более) двухцепочечных областей и/или одну или более областей, характеризующихся структурой "петля-на-стебле". В некоторых вариантах осуществления комплементарная последовательность РНК представляет собой по меньшей мере примерно 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200 или более нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления комплементарная последовательность РНК имеет длину примерно от 40 до 260, от 45 до 250, от 50 до 240, от 60 до 230, от 65 до 220, от 70 до 210, от 70 до 200, от 70 до 190, от 70 до 180, от 70 до 170, от 70 до 160, от 70 до 150, от 70 до 140, от 70 до 130, от 70 до 120, от 70 до 110, от 70 до 100, от 70 до 90, от 70 до 80, от 75 до 200, от 80 до 190, от 85 до 180, от 90 до 170, 95 до 160, от 100 до 200, от 100 до 150, от 100 до 175, от 110 до 200, от 110 до 175, от 110 до 150 или от 105 до 140 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления дРНК имеет длину примерно от 60 до 200 (например, примерно от 60 до 150, от 65 до 140, от 68 до 130 или от 70 до 120) нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления комплементарная последовательность РНК имеет длину примерно 71 нуклеотида. В некоторых вариантах осуществления комплементарная последовательность РНК имеет длину примерно 111 нуклеотидов.

[00147] В некоторых вариантах осуществления dРНК, помимо комплементарной последовательности РНК, дополнительно содержит области для стабилизации dРНК, например, одну или более двухцепочечных областей и/или областей, характеризующихся структурой "петля-на-стебле". В некоторых вариантах осуществления двухцепочечная область или область "петля-на-стебле" dРНК содержит не более примерно 200, 150, 100, 50, 40, 30, 20, 10 или меньше пар оснований. В некоторых вариантах осуществления dРНК не содержит структуру "петля-на-стебле" или двухцепочечную область. В некоторых вариантах осуществления dРНК содержит домен, рекрутирующий ADAR. В некоторых вариантах осуществления dРНК не содержит домен, рекрутирующий ADAR.

[00148] dРНК может содержать одну или более модификаций. В некоторых вариантах осуществления dРНК имеет один или более модифицированных нуклеотидов, включая модификацию нуклеиновых оснований и/или модификацию каркаса. В некоторых вариантах осуществления dРНК имеет длину примерно от 60 до 200 нуклеотидов и включает одну или более модификаций (таких как 2'-О-метилирование и/или фосфоротиоат). В некоторых вариантах осуществления модифицированная dРНК содержит от 5'-конца до 3'-конца: 5'-участок, ошибку спаривания цитидина, прямо противоположного целевому А в целевой РНК, и 3'-участок, где 3'-участок не короче примерно 7 нт (например, не короче 8 нт, не короче 9 нт и не короче 10 нт) нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления 5'-участок не короче примерно 25 (например, не короче примерно 30, не короче примерно 35 нт, не короче примерно 40 нт и не короче примерно 45 нт) нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления 5'-участок имеет длину примерно от 25 до 85 нт нуклеотидов (например, примерно от 25 до 80 нт, от 25 до 75 нт, от 25 до 70 нт, от 25 до 65 нт, от 25 до 60 нт, от 30 до 55 нт, от 40 до 55 нт или от 45 до 55 нт нуклеотидов). В некоторых вариантах осуществления 3'-участок имеет длину примерно от 7 до 25 нт нуклеотидов (например, длиной примерно от 10 до 15 нт или от 21 до 25 нт нуклеотидов). В некоторых вариантах осуществления 5'-участок имеет длину примерно от 25 до 85 нт нуклеотидов (например, примерно от 25 до 80 нт, от 25 до 75 нт, от 25 до 70 нт, от 25 до 65 нт, от 25 до 60 нт, от 30 до 55 нт, от 40 до 55 нт или от 45 до 55 нт нуклеотидов), а 3'-участок имеет длину примерно от 7 до от 25 нт нуклеотидов (например, примерно от 10 до 15 нт или от 21 до 25 нт нуклеотидов). В некоторых вариантах осуществления 5'-участок длиннее, чем 3'-участок. В некоторых вариантах осуществления 5'-участок имеет длину примерно 55 нуклеотидов, а 3'-участок имеет длину примерно 15 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления положение ошибки спаривания цитидина в dРНК соответствует любой из dРНК, описанных в примерах в настоящем документе, и dРНК может быть представлена, например, в формате Хнт-с-Унт, где Х представляет собой длину 5'-участка, и У представляет собой длину 3'-

участка: 55нт-с-35нт, 55нт-с-25нт, 55нт-с-24нт, 55нт-с-23нт, 55нт-с-22нт, 55нт-с-21нт, 55нт-с-20нт, 55нт-с-19нт, 55нт-с-18нт, 55нт-с-17нт, 55нт-с-16нт, 55нт-с-15нт, 55нт-с-14нт, 55нт-с-13нт, 55нт-с-12нт, 55нт-с-11нт, 55нт-с-10нт, 55нт-с-9нт, 55нт-с-8нт, 55нт-с-7нт, 55нт-п-20нт, 50нт-п-20нт, 45нт-п-20нт, 55нт-п-15нт, 50нт-п-15нт, 45нт-с-45нт, 45нт-с-55нт, 54нт-с-12нт, 53нт-с-13нт, 52нт-с-14нт, 51нт-с-15нт, 50нт-с-16нт, 49нт-с-17нт, 48нт-с-18нт, 47нт-с-19нт, 46нт-с-20нт, 45нт-с-21нт, 44нт-с-22нт, 43нт-с-23нт, 54нт-с-15нт, 53нт-с-16нт, 52нт-с-17нт, 51нт-с-18нт, 50нт-с-19нт, 49нт-с-20нт, 48нт-с-21нт, 47нт-с-22нт, 46нт-с-23нт, 54нт-с-17нт, 53нт-п-18нт, 52нт-п-19нт, 51нт-п-20нт, 50нт-п-21нт, 49нт-п-22нт, 48нт-с-23.

[00149] В некоторых вариантах осуществления dPHK имеет длину примерно от 60 до 200 нуклеотидов и содержит одну или более модификаций (таких как 2'-О-метилирование и/или фосфоротиоат). В некоторых вариантах dPHK содержит 2'-О-метилирование в первых и последних 3 нуклеотидах и/или фосфоротиоат в первых и последних 3 межнуклеотидных связях. В некоторых вариантах осуществления dPHK содержит 2'-О-метилирование в первых и последних 3 нуклеотидах, фосфоротиоат в первых и последних 3 межнуклеотидных связях и 2'-О-метилирование в одном или более уридинах, например, во всех уридинах. В некоторых вариантах осуществления dPHK содержит 2'-О-метилирование в первых и последних 3 нуклеотидах, фосфоротиоат в первых и последних 3 межнуклеотидных связях, 2'-О-метилирование в одном, или более, или всех уридинах и модификацию в нуклеотиде, противоположном целевому аденозину, и/или одном или двух нуклеотидах, ближайших к нуклеотиду, противоположному целевому аденозину. В некоторых вариантах осуществления модификация нуклеотида, противоположного целевому аденозину, и/или одного или двух нуклеотидов, ближайших к нуклеотиду, противоположному целевому аденозину, представляет собой 2'-О-метилирование. В некоторых вариантах осуществления модификация нуклеотида, противоположного целевому аденозину, и/или одного или двух нуклеотидов, ближайших к нуклеотиду, противоположному целевому аденозину, представляет собой фосфоротрионатную связь, такую как 3'-фосфоротрионатная связь. В некоторых вариантах осуществления dPHK содержит 2'-О-метилирования в первых и последних 3 нуклеотидах, фосфоротиоаты в первых и последних 3 межнуклеотидных связях, 2'-О-метилирования во всех уридинах и 2'-О-метилирование в нуклеотиде, прилегающем к 3'-концу или 5'-концу нуклеотида, противоположного целевому аденозину. В некоторых вариантах осуществления dPHK содержит 2'-О-метилирования в первых и последних 3 нуклеотидах, фосфоротиоаты в первых и последних 3 межнуклеотидных связях, 2'-О-метилирования во всех уридинах и 3'-фосфоротиоат в нуклеотиде, противоположном целевому аденозину, и/или его 5' и/или 3' ближайшим нуклеотидам. В некоторых вариантах осуществления dPHK содержит 2'-О-

метиляции в первых и последних 5 нуклеотидах и фосфоротиаты в первых и последних 5 межнуклеотидных связях. Настоящее изобретение также относится к конструкции, содержащей описанную в настоящем документе dРНК. В контексте настоящего документа термин "конструкция" относится к молекулам ДНК или РНК, которые содержат кодирующую нуклеотидную последовательность, которая может быть транскрибирована в РНК или экспрессирована в белки. В некоторых вариантах осуществления конструкция содержит один или более регуляторных элементов, функционально связанных с нуклеотидной последовательностью, кодирующей РНК или белок. Когда конструкцию вводят в клетку-хозяин, в подходящих условиях, кодирующая нуклеотидная последовательность в конструкции может быть транскрибирована или экспрессирована.

[00150] В некоторых вариантах осуществления конструкция содержит промотор, который функционально связан или пространственно связан с кодирующей нуклеотидной последовательностью, так что промотор контролирует транскрипцию или экспрессию кодирующей нуклеотидной последовательности. Промотор может быть расположен на 5' (выше) кодирующей нуклеотидной последовательности под его контролем. Расстояние между промотором и кодирующей последовательностью может быть примерно таким же, как расстояние между этим промотором и контролируемым им геном в гене, от которого происходит промотор. Как известно в данной области техники, это расстояние может быть изменено без потери промоторной функции. В некоторых вариантах осуществления конструкция содержит 5' UTR и/или 3' UTR, которые регулируют транскрипцию или экспрессию кодирующей нуклеотидной последовательности.

[00151] В некоторых вариантах осуществления конструкция представляет собой вектор, кодирующий любую из dРНК по настоящему изобретению. Термин "вектор" относится к молекуле нуклеиновой кислоты, способной переносить другую нуклеиновую кислоту, с которой она связана. Векторы включают, но не ограничиваются ими, молекулы нуклеиновых кислот, которые являются одноцепочечными, двухцепочечными или частично двухцепочечными, молекулы нуклеиновой кислоты, которые содержат один или более свободных концов, без свободных концов (например, кольцевые), молекулы нуклеиновой кислоты, которые содержат ДНК, РНК или и то, и другое, и другие разновидности полинуклеотидов, известные в данной области техники. Один из типов вектора представляет собой "плазмиду", относящуюся к кольцевой двухцепочечной петле ДНК, в которую могут быть вставлены дополнительные сегменты ДНК, например, стандартными способами молекулярного клонирования. Некоторые векторы способны к автономной репликации в клетке-хозяине, в которую они введены (например,

бактериальные векторы, имеющие бактериальный источник репликации, и эписомальные векторы млекопитающих). Другие векторы (например, неэписомальные векторы млекопитающих) интегрируются в геном клетки-хозяина после введения в клетку-хозяина и, таким образом, реплицируются вместе с геномом хозяина. Более того, определенные векторы способны управлять транскрипцией или экспрессией кодирующих нуклеотидных последовательностей, с которыми они функционально связаны. Такие векторы называются в настоящем документе "векторами экспрессии".

[00152] Рекомбинантные векторы экспрессии могут содержать нуклеиновую кислоту по настоящему изобретению в форме, подходящей для транскрипции или экспрессии нуклеиновой кислоты в клетке-хозяине. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный вектор экспрессии включает один или более регуляторных элементов, которые могут быть выбраны на основе клеток-хозяев, применяемых для транскрипции или экспрессии, которые оперативно связаны с последовательностью нуклеиновой кислоты, подлежащей транскрипции или экспрессии. В рекомбинантном векторе экспрессии термин "функционально связанный" означает, что представляющая интерес нуклеотидная последовательность связана с регуляторным(и) элементом(ами) таким образом, который обеспечивает экспрессию нуклеотидной последовательности (например, в системе транскрипции/трансляции *in vitro* или в клетке-хозяине, когда вектор вводят в клетку-хозяин).

[00153] В некоторых вариантах осуществления обеспечена конструкция (например, вектор, такой как вирусный вектор), содержащая нуклеотидную последовательность, кодирующую dPНК. В некоторых вариантах осуществления обеспечена конструкция (например, вектор, такой как вирусный вектор), содержащая нуклеотидную последовательность, кодирующую ADAR. В некоторых вариантах осуществления обеспечена конструкция, содержащая первую нуклеотидную последовательность, кодирующую dPНК, и вторую нуклеотидную последовательность, кодирующую ADAR. В некоторых вариантах осуществления первая нуклеотидная последовательность и вторая нуклеотидная последовательность функционально связаны с одним и тем же промотором. В некоторых вариантах осуществления первая нуклеотидная последовательность и вторая нуклеотидная последовательность функционально связаны с разными промоторами. В некоторых вариантах осуществления промотор является индуцируемым. В некоторых вариантах осуществления конструкция не кодирует ADAR. В некоторых вариантах осуществления вектор дополнительно содержит последовательность(и) нуклеиновой кислоты, кодирующую ингибитор ADAR3 (например, кшПНК или миПНК ADAR3) и/или стимулятор интерферона (например, IFN- β).

Способы лечения

[00154] Способы редактирования РНК и композиции по настоящему изобретению можно применять для лечения или профилактики заболевания или состояния у индивидуума, включая, но не ограничиваясь ими, наследственные генетические заболевания и устойчивость к лекарственным средствам.

[00155] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способу редактирования целевой РНК в клетке индивидуума (например, человека) *ex vivo*, включающему редактирование целевой РНК с применением любого из описанных в настоящем документе способов редактирования РНК.

[00156] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способу редактирования целевой РНК в клетке индивидуума (например, человека) *ex vivo*, включающему введение dРНК или конструкции, кодирующей dРНК, в клетку индивидуума, где dРНК содержит комплементарную последовательность РНК, которая гибридизуется с целевой РНК, и где dРНК способна рекрутировать ADAR для дезаминирования целевого А в целевой РНК. В некоторых вариантах осуществления целевая РНК связана с заболеванием или состоянием индивидуума. В некоторых вариантах осуществления заболевание или состояние представляет собой наследственное генетическое заболевание или заболевание или состояние, связанное с одной или более приобретенными генетическими мутациями (например, устойчивость к лекарственным средствам). В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает получение клетки от индивидуума.

[00157] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способу лечения или профилактики заболевания или состояния у индивидуума (например, человека), включающему редактирование целевой РНК, связанной с заболеванием или состоянием, в клетке индивидуума с применением любого из описанных в настоящем документе способов редактирования РНК.

[00158] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способу лечения или профилактики заболевания или состояния у индивидуума (например, человека), включающему введение dРНК или конструкции, кодирующей dРНК, в выделенную клетку индивидуума *ex vivo*, где dРНК содержит комплементарную последовательность РНК, которая гибридизуется с целевой РНК, связанной с заболеванием или состоянием, и где dРНК способна рекрутировать ADAR для дезаминирования целевого А в целевой РНК. В некоторых вариантах осуществления ADAR представляет собой эндогенно экспрессируемый ADAR в выделенной клетке. В некоторых вариантах осуществления способ включает введение ADAR или конструкции, кодирующей ADAR, в

выделенную клетку. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает культивирование клетки, имеющей отредактированную РНК. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает введение индивидууму клетки, содержащей отредактированную РНК. В некоторых вариантах осуществления заболевание или состояние представляет собой наследственное генетическое заболевание или заболевание или состояние, связанное с одной или более приобретенными генетическими мутациями (например, устойчивость к лекарственным средствам).

[00159] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способу лечения или профилактики заболевания или состояния у индивидуума (например, человека), включающему введение dРНК или конструкции, кодирующей dРНК, в выделенную клетку индивидуума *ex vivo*, где dРНК содержит комплементарную последовательность РНК, которая гибридизуется с целевой РНК, связанной с заболеванием или состоянием, и где dРНК способна рекрутировать эндогенно экспрессируемый ADAR клетки-хозяина для дезаминирования целевого А в целевой РНК. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает культивирование клетки, имеющей отредактированную РНК. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает введение индивидууму клетки, содержащей отредактированную РНК. В некоторых вариантах осуществления заболевание или состояние представляет собой наследственное генетическое заболевание или заболевание или состояние, связанное с одной или более приобретенными генетическими мутациями (например, устойчивость к лекарственным средствам).

[00160] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способу лечения или профилактики заболевания или состояния у индивидуума (например, человека), включающему введение эффективного количества dРНК или конструкции, кодирующей dРНК, индивидууму, где dРНК содержит комплементарную последовательность РНК, которая гибридизуется с целевой РНК, связанной с заболеванием или состоянием, и где dРНК способна рекрутировать ADAR для дезаминирования целевого А в целевой РНК. В некоторых вариантах осуществления ADAR представляет собой эндогенно экспрессируемый ADAR в клетках индивидуума. В некоторых вариантах осуществления способ включает введение индивидууму ADAR или конструкции, кодирующей ADAR. В некоторых вариантах осуществления заболевание или состояние представляет собой наследственное генетическое заболевание или заболевание или состояние, связанное с одной или более приобретенными генетическими мутациями (например, устойчивость к лекарственным средствам).

[00161] Заболевания и состояния, подходящие для лечения с применением способов

по настоящему изобретению, включают заболевания, связанные с мутацией, такой как мутация G в A, например, мутация G в A, которая приводит к миссенс-мутации, раннему стоп-кодону, абберрантному сплайсингу или альтернативному сплайсингу в транскрипте РНК. Примеры связанных с заболеванием мутаций, которые могут быть восстановлены способами по настоящему изобретению, включают, но не ограничиваются ими, TP53^{W53X} (например, 158G>A), связанную с раком, IDUA^{W402X} (например, мутацию TGG>TAG в экзоне 9), связанную с мукополисахаридозом типа I (MPS I), COL3A1^{W1278X} (например, мутацию 3833G>A), связанную с синдромом Элерса-Данлоса, BMPR2^{W298X} (например, 893G>A), связанную с первичной легочной гипертензией, ANH1^{W725X} (например, 2174G>A), связанную с синдромом Жубера, FANCC^{W506X} (например, 1517G>A), связанную с анемией Фанкони, MYBPC3^{W1098X} (например, 3293G>A), связанную с первичной наследственной гипертрофической кардиомиопатией, и IL2RG^{W237X} (например, 710G>A), связанную с X-сцепленным тяжелым комбинированным иммунодефицитом. В некоторых вариантах осуществления заболевание или состояние представляет собой рак. В некоторых вариантах осуществления заболевание или состояние представляет собой моногенетическое заболевание. В некоторых вариантах осуществления заболевание или состояние представляет собой полигенетическое заболевание.

[00162] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способу лечения рака, связанного с целевой РНК, имеющей мутацию (например, мутацию G>A), у индивидуума, включающему введение dРНК или конструкции, кодирующей dРНК, в выделенную клетку индивидуума *ex vivo*, где dРНК содержит комплементарную последовательность РНК, которая гибридизуется с целевой РНК, и где dРНК способна рекрутировать ADAR для дезаминирования целевого A в целевой РНК, тем самым сохраняя мутацию в целевой РНК. В некоторых вариантах осуществления ADAR представляет собой эндогенно экспрессируемый ADAR в выделенной клетке. В некоторых вариантах осуществления способ включает введение ADAR или конструкции, кодирующей ADAR, в выделенную клетку. В некоторых вариантах осуществления целевая РНК представляет собой TP53^{W53X} (например, 158G>A). В некоторых вариантах осуществления dРНК содержит последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 195, 196 или 197.

[00163] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способу лечения или профилактики рака с помощью целевой РНК, имеющей мутацию (например, мутацию G>A) у индивидуума, включающему введение эффективного количества dРНК или конструкции, кодирующей dРНК, индивидууму, где dРНК содержит комплементарную последовательность РНК, которая гибридизуется с целевой РНК, связанной с заболеванием или состоянием, и где dРНК способна рекрутировать ADAR для

дезаминирования целевого А в целевой РНК, тем самым сохраняя мутацию в целевой РНК. В некоторых вариантах осуществления ADAR представляет собой эндогенно экспрессируемый ADAR в клетках индивидуума. В некоторых вариантах осуществления способ включает введение индивидууму ADAR или конструкции, кодирующей ADAR. В некоторых вариантах осуществления целевая РНК представляет собой TP53^{W53X} (например, 158G>A). В некоторых вариантах осуществления dРНК содержит последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 195, 196 или 197.

[00164] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способу лечения MPS I (например, синдрома Гурлера или синдрома Шейе), связанного с целевой РНК, имеющей мутацию (например, мутацию G>A), у индивидуума, включающему введение dРНК или конструкции, кодирующей dРНК, в выделенную клетку индивидуума *ex vivo*, где dРНК содержит комплементарную последовательность РНК, которая гибридизуется с целевой РНК, и где dРНК способна рекрутировать ADAR для дезаминирования целевого А в целевой РНК, тем самым сохраняя мутации в целевой РНК. В некоторых вариантах осуществления ADAR представляет собой эндогенно экспрессируемый ADAR в выделенной клетке. В некоторых вариантах осуществления способ включает введение ADAR или конструкции, кодирующей ADAR, в выделенную клетку. В некоторых вариантах осуществления целевая РНК представляет собой IDUA^{W402X} (например, мутация TGG>TAG в экзоне 9). В некоторых вариантах осуществления dРНК содержит последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 204 или 205.

[00165] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способу лечения или профилактики MPS I (например, синдрома Гурлера или синдрома Шейе) с помощью целевой РНК, имеющей мутацию (например, мутацию G>A), у индивидуума, включающему введение эффективного количества dРНК или конструкции, кодирующей dРНК, индивидууму, где dРНК содержит комплементарную последовательность РНК, которая гибридизуется с целевой РНК, связанной с заболеванием или состоянием, и где dРНК способна рекрутировать ADAR для дезаминирования целевого А в целевой РНК, тем самым сохраняя мутацию в целевой РНК. В некоторых вариантах осуществления ADAR представляет собой эндогенно экспрессируемый ADAR в клетках индивидуума. В некоторых вариантах осуществления способ включает введение индивидууму ADAR или конструкции, кодирующей ADAR. В некоторых вариантах осуществления целевой РНК является IDUA^{W402X} (например, мутация TGG>TAG в экзоне 9). В некоторых вариантах осуществления dРНК содержит последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 204 или 205.

[00166] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к

способу лечения заболевания или состояния синдрома Элерса-Данлоса, связанного с целевой РНК, имеющей мутацию (например, мутацию G>A), у индивидуума, включающему введение dРНК или конструкции, кодирующей dРНК, в выделенную клетку индивидуума *ex vivo*, где dРНК содержит комплементарную последовательность РНК, которая гибридизуется с целевой РНК, и где dРНК способна рекрутировать ADAR для дезаминирования целевого A в целевой РНК, тем самым сохраняя мутацию в целевой РНК. В некоторых вариантах осуществления ADAR представляет собой эндогенно экспрессируемый ADAR в выделенной клетке. В некоторых вариантах осуществления способ включает введение ADAR или конструкции, кодирующей ADAR, в выделенную клетку. В некоторых вариантах осуществления целевая РНК представляет собой COL3A1^{W1278X} (например, мутация 3833G>A). В некоторых вариантах осуществления dРНК содержит последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 198.

[00167] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способу лечения или профилактики синдрома Элерса-Данлоса с помощью целевой РНК, имеющей мутацию (например, мутацию G>A), у индивидуума, включающему введение эффективного количества dРНК или конструкции, кодирующей dРНК, индивидууму, где dРНК содержит комплементарную последовательность РНК, которая гибридизуется с целевой РНК, связанной с заболеванием или состоянием, и где dРНК способна рекрутировать ADAR для дезаминирования целевого A в целевой РНК, тем самым сохраняя мутацию в целевой РНК. В некоторых вариантах осуществления ADAR представляет собой эндогенно экспрессируемый ADAR в клетках индивидуума. В некоторых вариантах осуществления способ включает введение индивидууму ADAR или конструкции, кодирующей ADAR. В некоторых вариантах осуществления целевая РНК представляет собой COL3A1^{W1278X} (например, мутация 3833G>A). В некоторых вариантах осуществления dРНК содержит последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 198.

[00168] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способу лечения первичной легочной гипертензии, связанной с целевой РНК, имеющей мутацию (например, мутацию G>A), у индивидуума, включающему введение dРНК или конструкции, кодирующей dРНК, в выделенную клетку индивидуума *ex vivo*, где dРНК содержит комплементарную последовательность РНК, которая гибридизуется с целевой РНК, и где dРНК способна рекрутировать ADAR для дезаминирования целевого A в целевой РНК, тем самым сохраняя мутацию в целевой РНК. В некоторых вариантах осуществления ADAR представляет собой эндогенно экспрессируемый ADAR в выделенной клетке. В некоторых вариантах осуществления способ включает введение ADAR или конструкции, кодирующей ADAR, в выделенную клетку. В некоторых

вариантах осуществления целевая РНК представляет собой BМР2^{W298X} (например, 893G>A). В некоторых вариантах осуществления dРНК содержит последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 199.

[00169] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способу лечения или профилактики первичной легочной гипертензии с помощью целевой РНК, имеющей мутацию (например, мутацию G>A), у индивидуума, включающему введение эффективного количества dРНК или конструкции, кодирующей dРНК, индивидууму, где dРНК содержит комплементарную последовательность РНК, которая гибридизуется с целевой РНК, связанной с заболеванием или состоянием, и где dРНК способна рекрутировать ADAR для дезаминирования целевого А в целевой РНК, тем самым сохраняя мутацию в целевой РНК. В некоторых вариантах осуществления ADAR представляет собой эндогенно экспрессируемый ADAR в клетках индивидуума. В некоторых вариантах осуществления способ включает введение индивидууму ADAR или конструкции, кодирующей ADAR. В некоторых вариантах осуществления целевая РНК представляет собой BМР2^{W298X} (например, 893G>A). В некоторых вариантах осуществления dРНК содержит последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 199.

[00170] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способу лечения синдрома Жубера, связанного с целевой РНК, имеющей мутацию (например, мутацию G>A), у индивидуума, включающему введение dРНК или конструкции, кодирующей dРНК, в выделенную клетку индивидуума ex vivo, где dРНК содержит комплементарную последовательность РНК, которая гибридизуется с целевой РНК, и где dРНК способна рекрутировать ADAR для дезаминирования целевого А в целевой РНК, тем самым сохраняя мутацию в целевой РНК. В некоторых вариантах осуществления ADAR представляет собой эндогенно экспрессируемый ADAR в выделенной клетке. В некоторых вариантах осуществления способ включает введение ADAR или конструкции, кодирующей ADAR, в выделенную клетку. В некоторых вариантах осуществления целевая РНК представляет собой АН1^{W725X} (например, 2174G>A). В некоторых вариантах осуществления dРНК содержит последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 200.

[00171] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способу лечения или профилактики синдрома Жубера с помощью целевой РНК, имеющей мутацию (например, мутацию G>A), у индивидуума, включающему введение эффективного количества dРНК или конструкции, кодирующей dРНК, индивидууму, где dРНК содержит комплементарную последовательность РНК, которая гибридизуется с целевой РНК, связанной с заболеванием или состоянием, и где dРНК способна

рекрутировать ADAR для дезаминирования целевого А в целевой РНК, тем самым сохраняя мутацию в целевой РНК. В некоторых вариантах осуществления ADAR представляет собой эндогенно экспрессируемый ADAR в клетках индивидуума. В некоторых вариантах осуществления способ включает введение индивидууму ADAR или конструкции, кодирующей ADAR. В некоторых вариантах осуществления целевая РНК представляет собой AHI1^{W725X} (например, 2174G>A). В некоторых вариантах осуществления dРНК содержит последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 200.

[00172] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способу лечения анемии Фанкони, связанной с целевой РНК, имеющей мутацию (например, мутацию G>A), у индивидуума, включающий введение dРНК или конструкции, кодирующей dРНК, в выделенную клетку индивидуума ex vivo, где dРНК содержит комплементарную последовательность РНК, которая гибридизуется с целевой РНК, и где dРНК способна рекрутировать ADAR для дезаминирования целевого А в целевой РНК, тем самым сохраняя мутацию в целевой РНК. В некоторых вариантах осуществления ADAR представляет собой эндогенно экспрессируемый ADAR в выделенной клетке. В некоторых вариантах осуществления способ включает введение ADAR или конструкции, кодирующей ADAR, в выделенную клетку. В некоторых вариантах осуществления целевая РНК представляет собой FANCC^{W506X} (например, 1517G>A). В некоторых вариантах осуществления dРНК содержит последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 201.

[00173] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способу лечения или профилактики анемии Фанкони с помощью целевой РНК, имеющей мутацию (например, мутацию G>A), у индивидуума, включающему введение эффективного количества dРНК или конструкции, кодирующей dРНК, индивидууму, где dРНК содержит комплементарную последовательность РНК, которая гибридизуется с целевой РНК, связанной с заболеванием или состоянием, и где dРНК способна рекрутировать ADAR для дезаминирования целевого А в целевой РНК, тем самым сохраняя мутацию в целевой РНК. В некоторых вариантах осуществления ADAR представляет собой эндогенно экспрессируемый ADAR в клетках индивидуума. В некоторых вариантах осуществления способ включает введение индивидууму ADAR или конструкции, кодирующей ADAR. В некоторых вариантах осуществления целевая РНК представляет собой FANCC^{W506X} (например, 1517G>A). В некоторых вариантах осуществления dРНК содержит последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 201.

[00174] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способу лечения первичной наследственной гипертрофической кардиомиопатии, связанной с целевой РНК, имеющей мутацию (например, мутацию G>A), у индивидуума,

включающему введение dРНК или конструкции, кодирующей dРНК, в выделенную клетку индивидуума *ex vivo*, где dРНК содержит комплементарную последовательность РНК, которая гибридизуется с целевой РНК, и где dРНК способна рекрутировать ADAR для дезаминирования целевого А в целевой РНК, тем самым сохраняя мутацию в целевой РНК. В некоторых вариантах осуществления ADAR представляет собой эндогенно экспрессируемый ADAR в выделенной клетке. В некоторых вариантах осуществления способ включает введение ADAR или конструкции, кодирующей ADAR, в выделенную клетку. В некоторых вариантах осуществления целевая РНК представляет собой MYBPC3^{W1098X} (например, 3293G>A). В некоторых вариантах осуществления dРНК содержит последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 202.

[00175] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способу лечения или профилактики первичной наследственной гипертрофической кардиомиопатии с целевой РНК, имеющей мутацию (например, мутацию G>A), у индивидуума, включающему введение эффективного количества dРНК или конструкции, кодирующей dРНК, индивидууму, где dРНК содержит комплементарную последовательность РНК, которая гибридизуется с целевой РНК, ассоциированной с заболеванием или состоянием, и где dРНК способна рекрутировать ADAR для дезаминирования целевого А в целевой РНК, тем самым сохраняя мутацию в целевой РНК. В некоторых вариантах осуществления ADAR представляет собой эндогенно экспрессируемый ADAR в клетках индивидуума. В некоторых вариантах осуществления способ включает введение индивидууму ADAR или конструкции, кодирующей ADAR. В некоторых вариантах осуществления целевая РНК представляет собой MYBPC3^{W1098X} (например, 3293G>A). В некоторых вариантах осуществления dРНК содержит последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 202.

[00176] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способу лечения X-сцепленного тяжелого комбинированного иммунодефицита, связанного с целевой РНК, имеющей мутацию (например, мутацию G>A), у индивидуума, включающему введение dРНК или конструкции, кодирующей dРНК, в выделенную клетку индивидуума *ex vivo*, где dРНК содержит комплементарную последовательность РНК, которая гибридизуется с целевой РНК, и где dРНК способна рекрутировать ADAR для дезаминирования целевого А в целевой РНК, тем самым сохраняя мутацию в целевой РНК. В некоторых вариантах осуществления ADAR представляет собой эндогенно экспрессируемый ADAR в выделенной клетке. В некоторых вариантах осуществления способ включает введение ADAR или конструкции, кодирующей ADAR, в выделенную клетку. В некоторых вариантах осуществления целевая РНК представляет собой

IL2RG^{W237X} (например, 710G>A). В некоторых вариантах осуществления dPHK содержит последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 203.

[00177] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способу лечения или профилактики X-сцепленного тяжелого комбинированного иммунодефицита, с целевой РНК, имеющей мутацию (например, мутацию G>A), у индивидуума, включающему введение эффективного количества dPHK или конструкции, кодирующей dPHK, индивидууму, где dPHK содержит комплементарную последовательность РНК, которая гибридизуется с целевой РНК, связанной с заболеванием или состоянием, и где dPHK способна рекрутировать ADAR для дезаминирования целевого A в целевой РНК, тем самым сохраняя мутации в целевой РНК. В некоторых вариантах осуществления ADAR представляет собой эндогенно экспрессируемый ADAR в клетках индивидуума. В некоторых вариантах осуществления способ включает введение индивидууму ADAR или конструкции, кодирующей ADAR. В некоторых вариантах осуществления целевая РНК представляет собой IL2RG^{W237X} (например, 710G>A). В некоторых вариантах осуществления dPHK содержит последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 203.

[00178] В контексте настоящего изобретения термины "лечить" или "лечение" представляют собой подход к получению полезных или желаемых результатов, включая клинические результаты. Для целей настоящего изобретения полезные или желаемые клинические результаты включают, но не ограничиваются, один или более из следующих: уменьшение еще одного симптома, вызванного заболеванием, уменьшение степени заболевания, стабилизация заболевания (например, профилактика или замедление обострения заболевания), профилактика или замедление распространения (например, метастазирования) заболевания, профилактика или замедление возникновения или рецидива заболевания, отсрочка или замедление прогрессирования заболевания, улучшение болезненного состояния, обеспечение ремиссии (частичной или полной) заболевания, уменьшение дозы одного или более других лекарственных средств, необходимых для лечения заболевания, замедление прогрессирования заболевания, повышение качества жизни и/или продление выживаемости. Термин "лечение" также включает уменьшение патологических последствий заболевания или состояния. Способы по настоящему изобретению предусматривают любой один или более из данных аспектов лечения.

[00179] Термины "индивидуум", "субъект" и "пациент" в контексте настоящего изобретения используются взаимозаменяемо для описания млекопитающих, включая людей. Индивидуум включает, но не ограничивается ими, человека, крупный рогатый скот,

лошадь, кошку, собаку, грызуна или примата. В некоторых вариантах осуществления индивидуум представляет собой человека. В некоторых вариантах осуществления индивидуум страдает заболеванием или состоянием, например, устойчивостью к лекарственному средству. В некоторых вариантах осуществления индивидуум нуждается в лечении.

[00180] Как понятно в данной области техники, "эффективное количество" относится к количеству композиции (например, dРНК или конструкции, кодирующей dРНК), достаточному для получения желаемого терапевтического результата (например, уменьшения тяжести или продолжительности, стабилизации тяжести или устранение одного, или более симптомов заболевания или состояния). Для терапевтического применения полезные или желаемые результаты включают, например, уменьшение одного или более симптомов, возникающих в результате заболевания (биохимических, гистологических и/или поведенческих), включая его осложнения и промежуточные патологические фенотипы, представленные во время развития заболевания, повышение качества жизни тех, кто страдает заболеванием или состоянием, уменьшение дозы других лекарственных средств, необходимых для лечения заболевания, усиление эффекта другого лекарственного средства, замедление прогрессирования заболевания и/или продление выживаемости пациентов.

[00181] Обычно дозировки, режимы и пути введения композиций (например, dРНК или конструкция, кодирующая dРНК) могут быть определены в соответствии с размером и состоянием индивидуума и в соответствии со стандартной фармацевтической практикой. Примеры способов введения включают внутривенный, внутриартериальный, внутрибрюшинный, внутрилегочный, интравезикулярный, внутримышечный, интратрахеальный, подкожный, внутриглазной, интратекальный или трансдермальный.

[00182] Способы редактирования РНК по настоящему изобретению можно применять не только в клетках животных, например, в клетках млекопитающих, но также можно применять для модификации РНК растений или грибов, например, в растениях или грибах, которые эндогенно экспрессируют ADAR. Способы по настоящему изобретению можно применять для создания генетически модифицированных растений и грибов с улучшенными свойствами.

[00183] Композиции, наборы и промышленные изделия

[00184] Настоящее изобретение относится к композициям (таким как фармацевтические композиции), содержащим любую из dРНК, конструкций, библиотек или клеток-хозяев, имеющих отредактированную РНК, по настоящему изобретению.

[00185] В некоторых вариантах осуществления обеспечена фармацевтическая

композиция, содержащая любую из dРНК или конструкций, кодирующих dРНК, по настоящему изобретению, и фармацевтически приемлемые носители, эксципиенты или стабилизаторы (Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)). Приемлемые носители, эксципиенты или стабилизаторы нетоксичны для реципиентов в применяемых дозировках и концентрациях и включают буферы, такие как фосфат, цитрат и другие органические кислоты, антиоксиданты, включая аскорбиновую кислоту и метионин, консерванты (такие как хлорид октадецилдиметилбензиламмония, хлорид гексаметония, хлорид бензалкония, хлорид бензетония, фенол, бутиловый или бензиловый спирт, алкилпарабены, такие как метил или пропилпарабен, катехол, резорцин, циклогексанол, 3-пентанол и м-крезол), полипептиды с низкой молекулярной массой (менее примерно 10 остатков), белки, такие как сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины, гидрофильные полимеры, такие как оливинилпирролидон, аминокислоты, такие как глицин, глутамин, аспарагин, гистидин, аргинин или лизин, моносахариды, дисахариды и другие углеводы, включая глюкозу, маннозу или декстрины, хелатирующие агенты, такие как ЭДТА (этилендиаминтетрауксусная кислота), сахара, такие как сахароза, маннит, трегалоза или сорбитол, солеобразующие противоионы, такие как натрий, комплексы металлов (например, комплексы Zn-белок), и/или неионные поверхностно-активные вещества, такие как TWEEN™, PLURONIC™ или полиэтиленгликоль (ПЭГ). В некоторых вариантах осуществления обеспечены лиофилизированные составы. Фармацевтические композиции, применяемые для введения *in vivo*, должны быть стерильными. Этого легко можно достигнуть, например, фильтрацией через стерильные фильтрующие мембраны.

[00186] Настоящее изобретение также относится к наборам, применимым для любого из способов редактирования РНК или способов лечения по настоящему изобретению, содержащим любую из dРНК, конструкций, композиций, библиотек или отредактированных клеток-хозяев, как описано в настоящем документе.

[00187] В некоторых вариантах осуществления обеспечен набор для редактирования целевой РНК в клетке-хозяине, содержащий dРНК, где dРНК содержит комплементарную последовательность РНК, которая гибридизуется с целевой РНК, где dРНК способна рекрутировать ADAR для дезаминирования А в целевой РНК. В некоторых вариантах осуществления набор дополнительно включает ADAR или конструкцию, кодирующую ADAR. В некоторых вариантах осуществления набор дополнительно включает ингибитор ADAR3 или его конструкцию. В некоторых вариантах осуществления набор дополнительно включает стимулятор интерферона или его конструкцию. В некоторых вариантах осуществления набор дополнительно содержит инструкцию по выполнению любого из

описанных в настоящем документе способов редактирования РНК.

[00188] Наборы по настоящему изобретению обеспечены в подходящей упаковке. Подходящая упаковка включает, но не ограничивается, флаконы, бутылки, банки, гибкую упаковку (например, герметичные майларовые или пластиковые пакеты) и т.п. Наборы могут необязательно включать дополнительные компоненты, такие как реагенты для трансфекции или трансдукции, среду для культивирования клеток, буферы и информацию для интерпретации.

[00189] Настоящая заявка, таким образом, также обеспечивает промышленные изделия. Изделие может содержать контейнер и этикетку или листок-вкладыш на контейнере или сопровождающий его. Подходящие контейнеры включают флаконы (такие как запечатанные флаконы), бутылки, банки, гибкую упаковку и т.п. В некоторых вариантах осуществления контейнер содержит фармацевтическую композицию и может иметь порт для стерильного доступа (например, контейнер может представлять собой пакет с раствором для внутривенного введения или флакон, имеющий пробку, которую можно проткнуть иглой для подкожных инъекций). Контейнер, содержащий фармацевтическую композицию, может быть многоразовым флаконом, который позволяет повторные введения (например, от 2-6 введений) растворенной композиции. Листок-вкладыш относится к инструкциям, обычно включаемым в коммерческие упаковки терапевтических продуктов, которые содержат информацию о показаниях, применении, дозировке, введении, противопоказаниях и/или предупреждениях относительно применения таких продуктов. Кроме того, промышленное изделие может дополнительно содержать второй контейнер, содержащий фармацевтически приемлемый буфер, такой как бактериостатическая вода для инъекций (BWFI), фосфатно-солевой буфер, раствор Рингера и раствор декстрозы. Он может дополнительно включать другие материалы, желательные с коммерческой точки зрения и с точки зрения пользователя, включая другие буферы, разбавители, фильтры, иглы и шприцы.

[00190] Наборы или промышленное изделие могут включать несколько стандартных доз фармацевтических композиций и инструкции по применению, упакованные в количествах, достаточных для хранения и применения в аптеках, например, в больничных аптеках и рецептурных аптеках.

Иллюстративные варианты осуществления

[00191] Среди представленных в настоящем документе вариантов осуществления:

1. Способ редактирования целевой РНК в клетке-хозяин, включающий введение РНК, рекрутирующей дезаминазу (dРНК), или конструкции, кодирующей dРНК, в клетку-

хозяин, где dРНК содержит комплементарную последовательность РНК, которая гибридизуется с целевой РНК, и где РНК, рекрутирующая дезаминазу, способна рекрутировать аденозиндезаминазу, действующую на РНК (ADAR), для дезаминирования целевого аденозина в целевой РНК.

2. Способ по варианту осуществления 1, где последовательность РНК содержит цитидин, аденозин или уридин, прямо противоположный целевому аденозину в целевой РНК.

3. Способ по варианту осуществления 2, где последовательность РНК содержит ошибочно спаренный цитидин, прямо противоположный целевому аденозину в целевой РНК.

4. Способ по варианту осуществления 3, где ошибочно спаренный цитидин расположен по меньшей мере на 20 нуклеотидов от 3'-конца комплементарной последовательности и по меньшей мере на 5 нуклеотидов от 5'-конца комплементарной последовательности в dРНК.

5. Способ по варианту осуществления 4, где ошибочно спаренный цитидин расположен в пределах 10 нуклеотидов от центра (например, в центре) комплементарной последовательности в dРНК.

6. Способ по любому из вариантов осуществления 1-5, где последовательность РНК дополнительно содержит один или более гуанозинов, каждый из которых противоположен нецелевому аденозину в целевой РНК.

7. Способ по любому из вариантов осуществления 1-6, где комплементарная последовательность содержит два или более последовательных ошибочно спаренных нуклеотида, противоположных нецелевому аденозину в целевой РНК.

8. Способ по любому из вариантов осуществления 1-7, где 5' ближайший сосед целевого аденозина в целевой РНК представляет собой нуклеотид, выбранный из U, C, A и G, предпочтительно $U > C \approx A > G$, и 3' ближайший сосед целевого аденозина в целевой РНК представляет собой нуклеотид, выбранный из G, C, A и U, предпочтительно $G > C > A \approx U$.

9. Способ по любому из вариантов осуществления 1-8, где целевой аденозин находится в мотиве из трех оснований, выбранном из группы, состоящей из UAG, UAC, UAA, UAU, CAG, CAC, CAA, CAU, AAG, AAC, AAA, AAU, GAG, GAC, GAA и GAU, в целевой РНК.

10. Способ по варианту осуществления 9, где мотив из трех оснований представляет собой UAG, и где РНК, рекрутирующая дезаминазу, включает A, прямо противоположный уридину в мотиве из трех оснований, цитидин, прямо противоположный целевому аденозину, и цитидин, гуанозин или уридин, прямо противоположный гуанозину в мотиве

из трех оснований.

11. Способ по любому из вариантов осуществления 1-10, где РНК, рекрутирующая дезаминазу, имеет длину примерно от 40 до 260 нуклеотидов.

12. Способ по варианту осуществления 11, где РНК, рекрутирующая дезаминазу, имеет длину примерно от 60 до 230 нуклеотидов.

13. Способ по варианту осуществления 11 или 12, где dРНК имеет длину более примерно 60 нуклеотидов.

14. Способ по любому из вариантов осуществления 11-13, где dРНК имеет длину от примерно 100 до примерно 150 (например, примерно от 110 до 150) нуклеотидов.

15. Способ по любому из вариантов осуществления 1-14, где целевая РНК представляет собой РНК, выбранную из группы, состоящей из предшественника мРНК, матричной РНК, рибосомной РНК, транспортной РНК, длинной некодирующей РНК и малой РНК.

16. Способ по варианту осуществления 15, где целевая РНК представляет собой предшественник мРНК.

17. Способ по любому из вариантов осуществления 1-16, где ADAR эндогенно экспрессируется клеткой-хозяином.

18. Способ по любому из вариантов осуществления 1-16, где ADAR является экзогенным по отношению к клетке-хозяину.

19. Способ по варианту осуществления 18, дополнительно включающий введение ADAR в клетку-хозяин.

20. Способ по варианту осуществления 18 или 19, где ADAR содержит мутацию E1008.

21. Способ по любому из вариантов осуществления 1-20, где РНК, рекрутирующая дезаминазу, представляет собой одноцепочечную РНК.

22. Способ по любому из вариантов осуществления 1-20, где комплементарная последовательность РНК является одноцепочечной, и где РНК, рекрутирующая дезаминазу, дополнительно содержит одну или более двухцепочечных областей.

23. Способ по любому из вариантов осуществления 1-22, где dРНК не содержит домен, рекрутирующий ADAR (например, DSB-связывающий домен, GluR2-домен или MS2-домен).

24. Способ по любому из вариантов осуществления 1-23, где dРНК не содержит химически модифицированный нуклеотид (например, 2'-О-метилирование или фосфоротиоат).

25. Способ по варианту осуществления 26, где дезаминирование целевого аденозина

в целевой РНК приводит к точечной мутации, усечению, удлинению и/или неправильной укладке белка, кодируемого целевой РНК, или функционального, полноразмерного, правильно уложенного белка и/или белка дикого типа путем обращения миссенс-мутации, раннего стоп-кодона, абберантного сплайсинга или альтернативного сплайсинга в целевой РНК.

26. Способ по любому из вариантов осуществления 1-27, где клетка-хозяин представляет собой эукариотическую клетку.

27. Способ по варианту осуществления изобретения 28, где клетка-хозяин представляет собой клетку млекопитающего.

28. Способ по варианту осуществления 29, где клетка-хозяин представляет собой клетку человека или мыши.

29. Способ по варианту осуществления 29 или 30, где ADAR представляет собой ADAR1 и/или ADAR2.

30. Способ по любому из вариантов осуществления 1-31, где клетка-хозяин представляет собой первичную клетку.

31. Способ по варианту осуществления 32, где клетка-хозяин представляет собой Т-клетку.

32. Способ по варианту осуществления 32, где клетка-хозяин представляет собой постмитотическую клетку.

33. Способ по любому из вариантов осуществления 1-34, дополнительно включающий введение ингибитора ADAR3 в клетку-хозяин.

34. Способ по любому из вариантов осуществления 1-35, дополнительно включающий введение стимулятора интерферона в клетку-хозяин.

35. Способ по любому из вариантов осуществления 1-36, включающий введение множества dРНК, каждая из которых нацелена на другую целевую РНК.

36. Способ по любому из вариантов осуществления 1-37, где эффективность редактирования целевой РНК составляет по меньшей мере примерно 30 % (например, по меньшей мере примерно 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 % или выше).

37. Способ по любому из вариантов осуществления 1-38, где dРНК не индуцирует иммунный ответ.

38. Отредактированная РНК или клетка-хозяин, имеющая отредактированную РНК, полученная способом по любому из вариантов осуществления 1-39.

39. Способ лечения или профилактики заболевания или состояния у индивидуума, включающий редактирование целевой РНК, связанной с заболеванием или состоянием, в

клетке индивидуума по любому из вариантов осуществления 1-39.

40. Способ по варианту осуществления 41, где заболевание или состояние представляет собой наследственное генетическое заболевание или заболевание или состояние, связанное с одной или более приобретенными генетическими мутациями.

41. Способ по варианту осуществления 41 или 42, где целевая РНК имеет мутацию G в A.

42. Способ по любому из вариантов осуществления 41-43, где заболевание или состояние представляет собой моногенетическое заболевание или состояние.

43. Способ по любому из вариантов осуществления 41-44, где заболевание или состояние представляет собой полигенетическое заболевание или состояние.

44. Способ по любому из вариантов осуществления 41-45, где:

(i) целевая РНК представляет собой TP53, и заболевание или состояние представляет собой рак,

(ii) целевая РНК представляет собой IDUA, и заболевание или состояние представляет собой мукополисахаридоз типа I (MPS I),

(iii) целевая РНК представляет собой COL3A1, и заболевание или состояние представляет собой синдром Элерса-Данлоса,

(iv) целевая РНК представляет собой BMPR2, и заболевание или состояние представляет собой синдром Жубера,

(v) целевая РНК представляет собой FANCC, и заболевание или состояние представляет собой анемию Фанкони,

(vi) целевая РНК представляет собой MYBPC3, и заболевание или состояние представляет собой первичную наследственную гипертрофическую кардиомиопатию, или

(vii) целевая РНК представляет собой IL2RG, и заболевание или состояние представляет собой X-сцепленный тяжелый комбинированный иммунодефицит.

45. РНК, рекрутирующая дезаминазу (dРНК), для дезаминирования целевого аденозина в целевой РНК путем рекрутирования аденозиндезаминазы, действующей на РНК (ADAR), включающая комплементарную последовательность РНК, которая гибридизуется с целевой РНК.

46. РНК, рекрутирующая дезаминазу, по варианту осуществления 47, где последовательность РНК содержит цитозин, аденозин или U, прямо противоположный целевому аденозину в целевой РНК.

47. dРНК по варианту осуществления изобретения 48, где последовательность РНК содержит ошибочно спаренный цитидин, прямо противоположный целевому аденозину в целевой РНК.

48. dРНК по варианту осуществления 49, где ошибочно спаренный цитидин расположен по меньшей мере на 20 нуклеотидов от 3'-конца комплементарной последовательности и по меньшей мере на 5 нуклеотидов от 5'-конца комплементарной последовательности в dРНК.

49. dРНК по варианту осуществления 50, где ошибочно спаренный цитидин расположен в пределах 10 нуклеотидов от центра (например, в центре) комплементарной последовательности в dРНК.

50. РНК, рекрутирующая дезаминазу, по любому из вариантов осуществления 47-51, где последовательность РНК дополнительно содержит один или более гуанозинов, каждый прямо противоположный нецелевому аденозину в целевой РНК.

51. dРНК по любому из вариантов осуществления 47-51, где комплементарная последовательность включает два или более последовательных ошибочно спаренных нуклеотида, противоположных нецелевому аденозину в целевой РНК.

52. РНК, рекрутирующая дезаминазу, по любому из вариантов осуществления 47-53, где целевой аденозин находится в мотиве из трех оснований, выбранном из группы, состоящей из UAG, UAC, UAA, UAU, CAG, CAC, CAA, CAU, AAG, AAC, AAA, AAU, GAG, GAC, GAA и GAU, в целевой РНК.

53. РНК, рекрутирующая дезаминазу, по варианту осуществления 54, где мотив из трех оснований представляет собой UAG, и где dРНК содержит аденозин, прямо противоположный уридину в мотиве из трех оснований, цитозин, прямо противоположный целевому аденозину, и цитидин, гуанозин или уридин, прямо противоположный гуанозину в мотиве из трех оснований.

54. РНК, рекрутирующая дезаминазу, по варианту осуществления 55, где мотив из трех оснований представляет собой UAG в целевой РНК, и где РНК, рекрутирующая дезаминазу, содержит ACC, ACG или ACU, противоположный UAG целевой РНК.

55. РНК, рекрутирующая дезаминазу, по любому из вариантов осуществления 47-56, имеющая длину примерно от 40 до 260 нуклеотидов.

56. dРНК по варианту осуществления 57, имеющая длину более примерно 70 нуклеотидов.

57. dРНК по варианту осуществления 57 или 58, имеющая длину от примерно 100 до примерно 150 нуклеотидов (например, примерно от 110 до 150).

58. dРНК по любому из вариантов осуществления 47-59, не содержащая домен, рекрутирующий ADAR (например, DSB-связывающий домен, GluR2-домен или MS2-домен).

59. dРНК по любому из вариантов осуществления 47-60, не содержащая химически

модифицированный нуклеотид (например, 2'-О-метилование или фосфоротиоат).

60. Конструкция, кодирующая РНК, рекрутирующую дезаминазу, по любому из вариантов осуществления 47-61.

61. Конструкция по варианту осуществления 62, где конструкция представляет собой вирусный вектор (например, лентивирусный вектор) или плазмиду.

62. Библиотека, содержащая множество РНК, рекрутирующих дезаминазу, по любому из вариантов осуществления 47-61 или конструкцию по варианту осуществления 62 или 63.

63. Композиция, содержащая РНК, рекрутирующую дезаминазу, по любому из вариантов осуществления 47-61, конструкцию по варианту осуществления 62 или 63 или библиотеку по варианту осуществления 64.

64. Клетка-хозяин, содержащая РНК, рекрутирующую дезаминазу, по любому из вариантов осуществления 47-61 или конструкцию по варианту осуществления 62 или 63.

65. Клетка-хозяин по варианту осуществления 66, где клетка-хозяин представляет собой эукариотическую клетку.

66. Клетка-хозяин по варианту осуществления 66 или 67, где клетка-хозяин представляет собой первичную клетку.

67. Набор для редактирования целевой РНК в клетке-хозяине, содержащий РНК, рекрутирующую дезаминазу, где РНК, рекрутирующая дезаминазу, содержит комплементарную последовательность РНК, которая гибридизуется с целевой РНК, где РНК, рекрутирующая дезаминазу, способна рекрутировать ADAR для дезаминирования целевого аденозина в целевой РНК.

68. РНК, рекрутирующая дезаминазу (dРНК), имеющая длину от 60 до 200 нуклеотидов, где:

1) dРНК содержит комплементарную последовательность РНК, способную гибридизоваться с целевой РНК,

2) dРНК способна рекрутировать дезаминазу или конструкцию, содержащую дезаминазу, или конструкцию, содержащую каталитический домен дезаминазы, для дезаминирования целевого аденозина в целевой РНК,

3) dРНК содержит одну или более химических модификаций.

69. dРНК по варианту осуществления 68, имеющая длину более примерно 60 нт, 65 нт, 70 нт, 80 нт, 90 нт, 100 нт или 110 нт.

70. dРНК по варианту осуществления 1 или варианту осуществления 69, содержащая одну или более ошибку спаривания, неоднозначность и/или выпетливание с комплементарной областью целевой РНК.

71. dРНК по любому из вариантов осуществления 68-70, где комплементарная последовательность РНК содержит цитидин, аденозин или уридин, прямо противоположный целевому аденозину в целевой РНК.

72. dРНК по варианту осуществления 71, где цитидин, аденозин или уридин, прямо противоположный целевому аденозину, расположен по меньшей мере примерно на 7 нуклеотидов от 3'-конца, например, по меньшей мере примерно на 8, 9, 10 или более нуклеотидов от 3'-конца или примерно от 7 до 25 нт от 3'-конца.

73. dРНК по любому из вариантов осуществления 71-72, где цитидин, аденозин или уридин, прямо противоположный целевому аденозину, расположен по меньшей мере примерно на 25 нуклеотидов от 5'-конца, например, по меньшей мере примерно на 30, 35, 40, 45, 50 или 55 нуклеотидов от 5'-конца или примерно от 45 до 55 нт от 5'-конца.

74. dРНК по любому из вариантов осуществления 71-73, где длины 5'- и 3'-последовательностей, фланкирующих цитидин, аденозин или уридин, прямо противоположный целевому аденозину, не равны.

75. dРНК по любому из вариантов осуществления 71-74, где длина 5'-последовательности, фланкирующей цитидин, аденозин или уридин, прямо противоположный целевому аденозину, больше, чем длина 3'-последовательности.

76. dРНК по любому из вариантов осуществления 68-75, содержащая цитидин, прямо противоположный целевому аденозину в целевой РНК.

77. dРНК по любому из вариантов осуществления 68-76, где комплементарная последовательность РНК содержит один или более гуанозинов, каждый из которых противоположен нецелевому аденозину в целевой РНК.

78. dРНК по любому из вариантов осуществления 68-77, где комплементарная последовательность содержит два или более последовательных ошибочно спаренных нуклеотида, противоположных нецелевому аденозину в целевой РНК.

79. dРНК по любому из вариантов осуществления 68-78, где 5' ближайший сосед целевого аденозина в целевой РНК представляет собой нуклеотид, выбранный из U, C, A и G, предпочтительно $U > C \approx A > G$, и 3' ближайший сосед целевого аденозина в целевой РНК представляет собой нуклеотид, выбранный из G, C, A и U, предпочтительно $G > C > A \approx U$.

80. dРНК по любому из вариантов осуществления 68-79, где целевой аденозин находится в мотиве из трех оснований, выбранном из группы, состоящей из UAG, UAC, UAA, UAU, CAG, CAC, CAA, CAU, AAG, AAC, AAA, AAU, GAG, GAC, GAA и GAU, в целевой РНК.

81. dРНК по варианту осуществления 80, где мотив из трех оснований представляет собой UAG, и где dРНК содержит A, прямо противоположный уридину в мотиве из трех

оснований, цитидин, прямо противоположный целевому аденозину, и цитидин, гуанозин или уридин, прямо противоположный гуанозину в мотиве из трех оснований.

82. dPHK по варианту осуществления 81, содержащая 5'-ССА-3', прямо противоположную мотиву из трех оснований UAG.

83. dPHK по любому из вариантов осуществления 68-82, где химическая модификация представляет собой метилирование и/или фосфоротиоат, например, 2'-О-метилирование и/или межнуклеотидную фосфоротиоатную связь.

84. dPHK по варианту осуществления 83, где химическая модификация включает 2'-О-метилирование в первых и последних от 1 до 5, от 2 до 5, от 3 до 5, от 4 до 5 нуклеотидах и/или фосфоротиоат в первых и последних от 1 до 5, от 2 до 5, от 3 до 5, от 4 до 5 межнуклеотидных связях.

85. dPHK по варианту осуществления 83 или варианту осуществления 84, где химическая модификация включает 2'-О-метилирование и/или 3'-фосфоротиоат в нуклеотиде, противоположном целевому аденозину, и/или его 5' и/или 3' ближайших нуклеотидах.

86. dPHK по любому из вариантов осуществления 1-85, где химическая модификация выбрана из группы, состоящей из:

1) 2'-О-метилирования в первых и последних 3 нуклеотидах и/или фосфоротиоата в первых и последних 3 межнуклеотидных связях,

2) 2'-О-метилирования в первых и последних 3 нуклеотидах, фосфоротиоата в первых и последних 3 межнуклеотидных связях и 2'-О-метилирования в одном или более уридинах, например, во всех уридинах,

3) 2'-О-метилирования в первых и последних 3 нуклеотидах, фосфоротиоата в первых и последних 3 межнуклеотидных связях, 2'-О-метилирования в одном, или более, или всех уридинах, и модификации нуклеотида, противоположного целевому аденозину, и/или его 5' и/или 3' ближайших нуклеотидах,

4) 2'-О-метилирования в первых и последних 3 нуклеотидах, фосфоротиоата в первых и последних 3 межнуклеотидных связях, 2'-О-метилирования во всех уридинах и 2'-О-метилирования в нуклеотиде, ближайшем к 3'-концу и/или 5'-концу нуклеотида, противоположного целевому аденозину,

5) 2'-О-метилирования в первых и последних 3 нуклеотидах, фосфоротиоата в первых и последних 3 межнуклеотидных связях, 2'-О-метилирования во всех уридинах и 3'-фосфоротиоата в нуклеотиде, противоположном целевому аденозину, и/или его 5' и/или 3' ближайших нуклеотидах, и

6) 2'-О-метилирования в первых и последних 5 нуклеотидах и фосфоротиоата в

первых и последних 5 межнуклеотидных связях.

87. dPHK по варианту осуществления 86, где модификация нуклеотида, противоположного целевому аденозину, и/или одного или двух нуклеотидов, ближайших к нуклеотиду, противоположному целевому аденозину, представляет собой 2'-О-метилирование или фосфоротиоатную связь, такую как 3'-фосфоротиоатная связь.

88. dPHK по любому из вариантов осуществления 68-87, не содержащая домен, рекрутирующий ADAR, способный образовывать внутримолекулярную структуру "петля-на-стебле" для связывания фермента ADAR.

89. Конструкция, содержащая или кодирующая dPHK по любому из вариантов осуществления 68-88.

90. Способ редактирования целевой РНК в клетке-хозяине, включающий введение dPHK по любому из вариантов осуществления 68-89 в клетки-хозяева, включая, но не ограничиваясь, эукариотическую клетку, первичную клетку, Т-клетку, клетку млекопитающего, клетку человека, клетку мыши и т.д., путем инфекции, электротрансфекции, липофекции, эндоцитоза, доставки липосом или липидных наночастиц и т.д.

91. Способ по варианту осуществления 90, дополнительно включающий введение ингибитора ADAR3 в клетку-хозяин.

92. Способ по варианту осуществления 90 или 91, дополнительно включающий введение стимулятора интерферона в клетку-хозяин.

93. Способ по любому из вариантов осуществления 90-92, включающий введение множества dPHK, каждая из которых нацелена на другую целевую РНК.

94. Способ по любому из вариантов осуществления 90-93, где dPHK не индуцирует иммунный ответ.

95. Способ по любому из вариантов осуществления 90-94, дополнительно включающий введение экзогенного ADAR в клетку-хозяин.

96. Способ по варианту осуществления 95, где ADAR представляет собой ADAR1, содержащий мутацию E1008.

97. Композиция, клетка, библиотека или набор, содержащая dPHK по любому из вариантов осуществления 68-89.

ПРИМЕРЫ

[00192] Приведенные ниже примеры предназначены исключительно для иллюстрации настоящей заявки и, следовательно, не должны рассматриваться как ограничивающие объем настоящего изобретения. Следующие ниже примеры и подробное

описание предлагаются для иллюстрации, а не для ограничения.

Материалы и способы

Конструирование плазмид

[00193] Репортер двойственной флуоресценции клонировали с помощью ПЦР-амплификации mCherry и кодирующей ДНК EGFP (был удален первый кодон EGFP ATG), линкер 3×GS и целевую последовательность ДНК добавляли через праймеры во время ПЦР. Затем продукты ПЦР расщепляли и связывали рестриктазами типа II BsmB1 (Thermo) и ДНК-лигазой T4 (NEB), которые затем вставляли в каркас pLenti (pLenti-CMV-MCS-SV-Bsd, Лаборатория Стэнли Коэна, Стэнфордский университет).

[00194] ДНК dLbuCas13 амплифицировали с помощью ПЦР из плазмид Lbu (Addgene # 83485). ADAR1DD и ADAR2DD амплифицировали с кДНК ADAR1(p150) и кДНК ADAR2, обе из которых были подарены лабораторией Хана в Университете Сямыня. ADAR1DD или ADAR2DD сливали с ДНК dLbuCas13 с помощью перекрывающейся ПЦР, и слитые продукты ПЦР вставляли в каркас pLenti.

[00195] Для экспрессии dPHK в клетках млекопитающих последовательности dPHK непосредственно синтезировали (для коротких dPHK) и отжигали или амплифицировали ПЦР путем синтеза перекрывающейся оцДНК, и продукты клонировали в соответствующие векторы при экспрессии U6 путем клонирования по "золотым воротам".

[00196] Полноразмерные ADAR1(p110) и ADAR1(p150) амплифицировали с помощью ПЦР с кДНК ADAR1(p150), а полноразмерные ADAR2 амплифицировали с помощью ПЦР с кДНК ADAR2, которые затем клонировали в каркасе pLenti, соответственно.

[00197] Для трех версий репортеров двойственной флуоресценции (Репортер-1, -2 и -3), mCherry и EGFP (стартовый кодон ATG EGFP удаляли) кодирующие последовательности амплифицировали с помощью ПЦР, расщепляли с применением BsmBI (Thermo Fisher Scientific, ER0452) с последующим лигированием, опосредованным ДНК-лигазой T4 (NEB, M0202L), с линкерами GGGGS. Затем продукт лигирования вставляли в каркас pLenti-CMV-MCS-PURO.

[00198] Для конструкции, экспрессирующей dLbuCas13-ADAR_{DD} (E1008Q), ген ADAR1DD амплифицировали из конструкции ADAR1^{p150} (подарок лаборатории Цзяхуай Хана, Сямэньский университет). Ген dLbuCas13 амплифицировали с помощью ПЦР из плазмиды Lbu_C2c2_R472A_H477A_R1048A_H1053A (Addgene # 83485). ADAR1_{DD} (гиперактивный вариант E1008Q) был создан с помощью перекрывающейся ПЦР, а затем слит с dLbuCas13. Продукты лигирования вставляли в каркас pLenti-CMV-MCS-BSD.

[00199] Для конструкции, экспрессирующей agPHK, последовательности agPHK

синтезировали и клонировали "золотыми воротами" в каркас pLenti-sgRNA-lib 2.0 (Addgene кат.№ 89638), и транскрипция агРНК управлялась промотором hU6. Для конструкций, экспрессирующих ADAR, полноразмерные ADAR1^{p110} и ADAR1^{p150} амплифицировали с помощью ПЦР из конструкции ADAR1^{p150}, а полноразмерные ADAR2 амплифицировали с помощью ПЦР из конструкции ADAR2 (подарок лаборатории Jiahuai Han, Университет Сямэня). Затем амплифицированные продукты клонировали в каркас pLenti-CMV-MCS-BSD.

[00200] Для конструкций, экспрессирующих гены с патогенными мутациями, полноразмерные кодирующие последовательности TP53 (заказанные у Vigenebio) и других 6 генов, связанных с заболеванием (COL3A1, BMPR2, AHI1, FANCC, MYBPC3 и IL2RG, предоставлены лабораторией Jianwei Wang, Институт биологии патогенов Китайской академии медицинских наук) амплифицировали из конструкций, кодирующих соответствующие гены, с введением мутаций G>A с помощью мутагенезной ПЦР. Амплифицированные продукты клонировали в каркас pLenti-CMV-MCS-mCherry с помощью способа клонирования Гибсона⁵⁹.

Клеточные линии млекопитающих и клеточная культура

[00201] Клеточные линии млекопитающих культивировали в среде Игла, модифицированной Дульбекко (10-013-CV, Corning, Тьюксбери, Массачусетс, США), с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки (Lanzhou Bailing Biotechnology Co., Ltd., Ланьчжоу, Китай) с добавлением с 1% пенициллина-стрептомицина в атмосфере 5% CO₂ при 37 °C. Клеточная линия ADAR1-KO была приобретена у EdiGene China, и результаты генотипирования также были предоставлены EdiGene China.

[00202] Клеточные линии HeLa и B16 были получены из лаборатории Z. Jiang (Пекинский университет). И клеточная линия HEK293T была получена из лаборатории C. Zhang (Пекинский университет). Клеточная линия RD была получена из лаборатории J Wang (Институт биологии патогенов, Пекинский медицинский колледж и Китайская академия медицинских наук). Клеточные линии SF268 были получены из Клеточного центра Института фундаментальных медицинских наук Китайской академии медицинских наук. A549 и SW13 клеточные линии были получены от EdiGene Inc. Клеточные линии HepG2, HT29, NIH3T3 и MEF содержали в лаборатории авторов изобретения в Пекинском университете. Указанные клеточные линии млекопитающих культивировали в среде Игла, модифицированной Дульбекко (Corning, 10-013-CV) с 10% фетальной бычьей сывороткой (CellMax, SA201.02), дополнительно с добавлением 1% пенициллина-стрептомицина в атмосфере 5% CO₂ при 37 °C. Если не указано иное, клетки трансфицировали реагентом для трансфекции ДНК X-tremeGENE HP (Roche, 06366546001) в соответствии с

инструкциями производителя.

[00203] Первичные легочные фибробласты человека (кат.№ 3300) и первичные бронхиальные эпителиальные клетки человека (кат.№ 3210) приобретали у ScienCell Research Laboratories, Inc. и культивировали в среде для фибробластов (ScienCell, кат.№ 2301) и среде для клеток бронхиального эпителия (ScienCell, кат.№ 3211) соответственно. В обе среды добавляли 15% фетальной бычьей сыворотки (BI) и 1% пенициллин-стрептомицин. Первичные GM06214 (фибробласт, полученный у пациента с синдромом Гурлера, гомозиготный по мутации TGG>TAG в нуклеotide 1293 в экзоне 9 гена IDUA [Trp402Ter (W402X)]) и GM01323 (фибробласт, полученный у пациента с синдромом Шейе, имеет 0,3 % активности IDUA по сравнению с клетками дикого типа. Гораздо более легкие симптомы, чем синдром Гурлера. Составная гетерозигота: переход G>A в интроне 5, в положении -7 от экзона 6 (IVS5AS-7G>A) и TGG>TAG на нуклеotide 1293 в экзоне 9 гена IDUA [Trp402Ter (W402X)]. Служащие положительным контролем в примерах настоящего изобретения) клетки заказывали в Институте медицинских исследований Кориелла и культивировали в среде Игла, модифицированной Дульбекко (Corning, 10-013-CV) с 15% фетальной телячьей сывороткой (BI) и 1% пенициллин-стрептомицин. Все клетки культивировали в атмосфере 5% CO₂ при 37 °C.

Трансфекция репортерной системы, анализ FACS и секвенирование по Сэнгеру

[00204] Для экспериментов по редактированию репортерной двойственной флуоресценции клетки 293T-WT или 293T-ADAR1-KO высевали в 6-луночные планшеты (6×10⁵ клеток/лунку), через 24 часа 1,5 мкг репортерных плазмид и 1,5 мкг плазмид dPHK. котрансфицировали с применением реагента для трансфекции ДНК X-tremeGENE HP (06366546001, Roche, Мангейм, Германия) в соответствии с протоколами поставщика. Спустя 48-72 часа собирали клетки и проводили анализ FACS. Для дальнейшего подтверждения редактирования репортерной мPHK отсортировали клетки положительные по EGFP из клеток 293T-WT, трансфицированных репортерными и dPHK плазмидами, с применением проточного цитометра FACS Aria (BD Biosciences), с последующим выделением общей РНК (TIANGEN, DP430). Затем РНК подвергали обратной транскрипции в кДНК с помощью ПЦР с обратной транскрипцией (TIANGEN, KR103-04), и целевой locus амплифицировали с помощью ПЦР с соответствующими парами праймеров (23 цикла ПЦР), и продукты ПЦР очищали для секвенирования по Сэнгеру.

[00205] Для экспериментов по спасению и сверхэкспрессии ADAR1(p110), ADAR1(p150) или ADAR2 клетки 293T-WT или клетки 293T-ADAR1-KO высевали в 12-луночные планшеты (2,5×10⁵ клеток/лунку), 24 часа спустя, 0,5 мкг репортерных плазмид, 0,5 мкг плазмид dPHK и 0,5 мкг плазмид ADAR1/2 (каркас pLenti в качестве контроля)

котрансфицировали с применением реагента для трансфекции ДНК X-tremeGENE HP (06366546001, Roche, Мангейм, Германия). Спустя 48-72 часа собирали клетки и проводили анализ FACS.

[00206] Для экспериментов с эндогенной мРНК клетки 293T-WT высевали в 6-луночные планшеты (6×10^5 клеток/лунку). При примерно 70% конфлюэнтности, 3 мкг плазмиды dРНК трансфицировали с применением реагента для трансфекции ДНК X-tremeGENE HP (06366546001, Roche, Мангейм, Германия). 72 часа спустя собирали клетки и отсортировывали GFP-положительные или BFP-положительные клетки (в зависимости от соответствующего производителя флуоресценции) с помощью FACS для последующего выделения РНК.

Выделение и культивирование первичных Т-клеток человека

[00207] Первичные Т-клетки человека выделяли из продуктов лейкофереза от здорового донора-человека. Вкратце, мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC) выделяли центрифугированием Ficoll (Dakewei, AS1114546), и Т-клетки выделяли магнитно-отрицательной селекцией с применением набора EasySep Human T Cell Isolation Kit (STEMCELL, 17951) из PBMC. После выделения Т-клетки культивировали в среде X-vivo15, 10% FBS и IL2 (1000 Ед/мл) и стимулировали CD3/CD28 DynaBeads (ThermoFisher, 11131D) в течение 2 дней. Продукты лейкофереза от здоровых доноров были приобретены у AllCells LLC China. Все здоровые доноры дали информированное согласие.

Построение пакетов лентивируса и линии репортерных клеток

[00208] Экспрессионную плазмиду котрансфицировали в клетки HEK293T-WT вместе с двумя вирусными упаковывающими плазмидами, pR8.74 и pVSVG (Addgene), с помощью реагента для трансфекции ДНК X-tremeGENE HP. 72 часа спустя супернатант вируса собирали и хранили при минус 80 °С. Клетки HEK293T-WT инфицировали лентивирусом, 72 часа спустя mCherry-положительные клетки отсортировывали с помощью FACS и культивировали для отбора клеточных линий одного клона, стабильно экспрессирующих репортерную систему двойственной флуоресценции с очень низким фоном EGFP, путем способа ограничивающего разведения.

[00209] Для стабильных линий репортерных клеток репортерные конструкции (каркас pLenti-CMV-MCS-PURO) котрансфицировали в клетки HEK293T вместе с двумя вирусными упаковывающими плазмидами, pR8.74 и pVSVG. 72 часа спустя супернатант вируса собирали и хранили при минус 80 °С. Клетки HEK293T инфицировали лентивирусом, затем mCherry-положительные клетки сортировали с помощью FACS и культивировали для отбора клеточных линий одного клона, стабильно экспрессирующих репортерную систему двойственной флуоресценции без детектируемого фона EGFP.

Клеточные линии HEK293T ADAR1^{-/-} и TP53^{-/-} были созданы в соответствии с ранее описанным способом⁶⁰. Нацеленная на ADAR1 sgРНК и ПЦР-амплифицированная донорская ДНК, содержащая CMV-управляемый ген устойчивости к пурамицину, котрансфицировали в клетки HEK293T. Затем через 7 дней после трансфекции клетки обрабатывали пурамицином. Отдельные клоны выделяли из устойчивых к пурамицину клеток с последующей проверкой посредством секвенирования и вестерн-блоттинга.

Редактирование РНК эндогенных или экзогенно экспрессируемых транскриптов

[00210] Для оценки редактирования РНК на репортере двойственной флуоресценции клетки HEK293T или клетки HEK293T ADAR1^{-/-} высевали в 6-луночные планшеты (6×10^5 клеток/лунку). Через 24 часа клетки котрансфицировали 1,5 мкг репортерных плазмид и 1,5 мкг плазмид агРНК. Чтобы изучить эффект экспрессии белков ADAR1^{p110}, ADAR1^{p150} или ADAR2, эффективность редактирования оценивали с помощью соотношения EGFP-положительных и глубокого секвенирования.

[00211] Клетки HEK293T ADAR1^{-/-} высевали в 12-луночные планшеты ($2,5 \times 10^5$ клеток/лунку). Через 24 часа клетки котрансфицировали 0,5 мкг репортерных плазмид, 0,5 мкг плазмид агРНК и 0,5 мкг плазмид ADAR1/2 (каркас pLenti в качестве контроля). Эффективность редактирования оценивали по соотношению EGFP-положительных и глубокому секвенированию.

[00212] Для оценки редактирования РНК на эндогенных транскриптах мРНК клетки HEK293T высевали в 6-луночные планшеты (6×10^5 клеток/лунку). Через 24 часа клетки трансфицировали 3 мкг плазмид агРНК. Эффективность редактирования оценивалась способом глубокого секвенирования.

[00213] Для оценки эффективности редактирования РНК во множестве клеточных линий $8-9 \times 10^4$ (RD, SF268, HeLa) или $1,5 \times 10^5$ (HEK293T) клеток высевали в 12-луночные планшеты. Для трудно трансфицируемых клеток, таких как HT29, A549, HepG2, SW13, NIH3T3, MEF и B16, в 6-луночный планшет засевали $2-2,5 \times 10^5$ клеток. Спустя 24 часа репортеры и плазмид агРНК котрансфицировали в эти клетки. Эффективность редактирования оценивали по соотношению EGFP-положительных.

[00214] Чтобы оценить соотношение EGFP-положительных, через 48-72 часа после трансфекции клетки сортировали и собирали с помощью анализа сортировки клеток с активацией флуоресценции (FACS). Сигнал mCherry служил в качестве флуоресцентного маркера селекции для репортерных/экспрессирующих агРНК клеток, и процентное содержание клеток EGFP⁺/mCherry⁺ рассчитывалось как показатель эффективности редактирования.

[00215] Для количественной оценки NGS скорости редактирования A в I через 48-72

часа после трансфекции клетки сортировали и собирали с помощью анализа FACS, а затем подвергали выделению РНК (TIANGEN, DP420). Затем общую РНК подвергали обратной транскрипции в кДНК с помощью ПЦР с обратной транскрипцией (TIANGEN, KR103-04), и целевой locus амплифицировали ПЦР с соответствующими праймерами, перечисленными в Таблице 1.

Таблица 1.

Наименование праймера	Последовательность (5'--->3')
mCherry-SpeI-F	tataactagtatggtgagcaagggcgaggag (SEQ ID NO: 206)
mCherry-BsmBI-R1	tatacgtctcatctacagattctccggcgtgtataccttc (SEQ ID NO: 207)
EGFP-BsmBI-F1 (Репортер-1)	tatacgtctcatagatccccggtcgccaccgtgagcaagggcgaggagctg (SEQ ID NO: 208)
EGFP-AscI-R	tataggcgcgccttactgtacagctcgtccatgcc (SEQ ID NO: 209)
mCherry-BsmBI-R2	tatacgtctcaaggcgtgcctcctccgccgtgcctcctccgccgtgcctcctccgcc tgcagctgtacagctcgtccatgccgccgggtg (SEQ ID NO: 210)
EGFP-BsmBI-F2 (Репортер-2)	tatacgtctcagcctgctcgcatgtagagggctctgccagtgagcaagggcgaggag ctg (SEQ ID NO: 211)
LbuCas13-SpeI-F	tataactagtatggtggattacaaggatgacgacgataagatgaaagtacgaaggtagg aggcatttcg (SEQ ID NO: 212)
LbuCas13-AscI-R	atatggcgcgcgcttttcagactttttcttccattttgtattcaaacataatcttcac (SEQ ID NO: 213)
hADAR1 _{DD} -AscI-F	TATAGGCGCGCCAGGCGGAGGAGGCAGCGGCGGAGG AGGCAGCCTCCTCCTCTCAAGGTCCCCAGAAGC (SEQ ID NO: 214)
hADAR1 _{DD} -SbfI-R	tatacctgcaggctacaccttgcgtttttcttgggtactgggcagagataaaagttctttcc (SEQ ID NO: 215)
Deep-seq-F (Репортер-1)	cactccaccggcgcatggacgag (SEQ ID NO: 216)

Deep-seq-R (Репортер-1)	cacgctgaactgtggccgtttacgtcg (SEQ ID NO: 217)
ADAR1-p150-SpeI-F	tataactagtagaatccgcggcaggggtattccctcagc (SEQ ID NO: 218)
ADAR1-p150-AscI-R	tataggcgcgccctacttatcgctgcatccttgtaatctactgggcagagataaaagtcttt tcctctgg (SEQ ID NO: 219)
ADAR2-SpeI-F	tataactagtaggatatagaagatgaagaaaacatgagttc (SEQ ID NO: 220)
ADAR2-AscI-R	tataggcgcgccctacttatcgctgcatccttgtaatcgggcgtgagtgagaactggctct gctcg (SEQ ID NO: 221)
ADAR1-p110-SpeI-F	tataactagtagggccgagatcaaggagaaaatctgc (SEQ ID NO: 222)
ADAR1-p110-AscI-R	tataggcgcgccctacttatcgctgcatccttgtaatctactgggcagagataaaagtcttt tcctctgg (SEQ ID NO: 223)
KRAS-deep-seq-F	cgccatttcggactgggag (SEQ ID NO: 224)
KRAS-deep-seq-R	agagacaggtttctccatcaattac (SEQ ID NO: 225)
PPIB-deep-seq-F	gagcccgcgagcaacc (SEQ ID NO: 226)
PPIB-deep-seq-R	gcagcaggaagaagacggac (SEQ ID NO: 227)
FANCC-deep-seq-F1 (TAC сайт)	agaagcagttgaagaccagactc (SEQ ID NO: 228)
FANCC-deep-seq-R (TAC сайт)	ggccttcacctggaccatag (SEQ ID NO: 229)
FANCC-deep-seq-F2 (TAC сайт)	agagaagcagttgaagaccaga (SEQ ID NO: 230)
FANCC-deep-seq-R2 (TAC сайт)	cggccttcacctggaccata (SEQ ID NO: 231)
FANCC-deep-seq-F3 (TAC	cagagaagcagttgaagaccaga

сайт)	(SEQ ID NO: 232)
FANCC-deep-seq-R3 (TAC сайт)	cggccttcacctggaccata (SEQ ID NO: 233)
SMAD4-deep-seq-F1	tttgtgaaaggctggggacc (SEQ ID NO: 234)
SMAD4-deep-seq-R1	acaggattgtattttgtagtcacc (SEQ ID NO: 235)
SMAD4-deep-seq-F2	aggatgagttttgtgaaaggctg (SEQ ID NO: 236)
SMAD4-deep-seq-R2	atttttagtccaccatcctgata (SEQ ID NO: 237)
SMAD4-deep-seq-F3	gatgagttttgtgaaaggctgg (SEQ ID NO: 238)
SMAD4-deep-seq-R3	atttttagtccaccatcctgataa (SEQ ID NO: 239)
TRAPPC12-deep-seq-F	cgaagagaacgagaccgcat (SEQ ID NO: 240)
TRAPPC12-deep-seq-R	gaagatgggtgcacaccggg (SEQ ID NO: 241)
TARDBP-deep-seq-F	gacagatgcttcacgacagtg (SEQ ID NO: 242)
TARDBP-deep-seq-R	cgaacaaagccaaacccttt (SEQ ID NO: 243)
COL3A1-deep-seq-F	tctgttaatggacaaatagaaagcc (SEQ ID NO: 244)
COL3A1-deep-seq-R	ggaacattcaaaggattggcact (SEQ ID NO: 245)
BMPR2-deep-seq-F	agtcactgcagatggacgca (SEQ ID NO: 246)
BMPR2-deep-seq-R	atctcgatgggaaattgcaggt (SEQ ID NO: 247)
AHI1-deep-seq-F	tcagagttttacctcatcctcttt (SEQ ID NO: 248)
AHI1-deep-seq-R	cctgaatacatatgatgaccttcag

	(SEQ ID NO: 249)
FANCC-deep-seq-F (сайт 2)	agggcacagacacagacctc (SEQ ID NO: 250)
FANCC-deep-seq-R (сайт 2)	agggctttcaatgccaagacg (SEQ ID NO: 251)
MYBPC3-deep-seq-F	tgacaagccaagtctctccc (SEQ ID NO: 252)
MYBPC3-deep-seq-R	attgccaatgatgagctctgg (SEQ ID NO: 253)
IL2RG-deep-seq-F	ttatagacataagttctcttgctt (SEQ ID NO: 254)
IL2RG-deep-seq-R	tcaatcccatggagccaaca (SEQ ID NO: 255)
1-deep-seq-F (Репортер-3)	tacacgacgctcttccgatcttaagtagaggccgcccactccaccggcggc (SEQ ID NO: 256)
2-deep-seq-F (Репортер-3)	tacacgacgctcttccgatctatcatgcttagccgcccactccaccggcggc (SEQ ID NO: 257)
3-deep-seq-F (Репортер-3)	tacacgacgctcttccgatctgatgcacatctgccgcccactccaccggcggc (SEQ ID NO: 258)
4-deep-seq-F (Репортер-3)	tacacgacgctcttccgatctcgattgctcgacgccgcccactccaccggcggc (SEQ ID NO: 259)
5-deep-seq-F (Репортер-3)	tacacgacgctcttccgatcttcgatagcaattcgccgcccactccaccggcggc (SEQ ID NO: 260)
6-deep-seq-F (Репортер-3)	tacacgacgctcttccgatctatcgatagttgcttgccgcccactccaccggcggc (SEQ ID NO: 261)
7-deep-seq-F (Репортер-3)	tacacgacgctcttccgatctgatcgatccagttaggccgcccactccaccggcggc (SEQ ID NO: 262)
8-deep-seq-F (Репортер-3)	tacacgacgctcttccgatctcgatcgattgagcctgccgcccactccaccggcggc (SEQ ID NO: 263)
9-deep-seq-F (Репортер-3)	tacacgacgctcttccgatctacgatcgatacacgatcgccgcccactccaccggcggc (SEQ ID NO: 264)
10-deep-seq-F (Репортер-3)	tacacgacgctcttccgatcttacgatcgatgggtccagagccgcccactccaccggcggc (SEQ ID NO: 265)
1-deep-seq-R (Репортер-3)	agacgtgtgctcttccgatcttaagtagagtcgccgtccagctcgaccag

	(SEQ ID NO: 266)
2-deep-seq-R (Penoprep-3)	agacgtgtgctcttccgatctatcatgcttatcgccgtccagctcgaccag (SEQ ID NO: 267)
3-deep-seq-R (Penoprep-3)	agacgtgtgctcttccgatctgatgcacatcttcgccgtccagctcgaccag (SEQ ID NO: 268)
4-deep-seq-R (Penoprep-3)	agacgtgtgctcttccgatctcgattgctcgactcgccgtccagctcgaccag (SEQ ID NO: 269)
5-deep-seq-R (Penoprep-3)	agacgtgtgctcttccgatcttcgatagcaattctcgccgtccagctcgaccag (SEQ ID NO: 270)
6-deep-seq-R (Penoprep-3)	agacgtgtgctcttccgatctatcgatagtgcttcgccgtccagctcgaccag (SEQ ID NO: 271)
7-deep-seq-R (Penoprep-3)	agacgtgtgctcttccgatctgatcgatccagttagtcgccgtccagctcgaccag (SEQ ID NO: 272)
8-deep-seq-R (Penoprep-3)	agacgtgtgctcttccgatctcgatcgattgagccttcgccgtccagctcgaccag (SEQ ID NO: 273)
9-deep-seq-R (Penoprep-3)	agacgtgtgctcttccgatctacgatcgatacacgatctcgccgtccagctcgaccag (SEQ ID NO: 274)
10-deep-seq-R (Penoprep-3)	agacgtgtgctcttccgatcttacgatcgatggccagatcgccgtccagctcgaccag (SEQ ID NO: 275)
ST3GAL1-deep-seq-F	ggggaactcgggcaacct (SEQ ID NO: 276)
ST3GAL1-deep-seq-R	gaatcggatctgccccgtg (SEQ ID NO: 277)
EHD2-deep-seq-F	catcgaggccaagctggaa (SEQ ID NO: 278)
EHD2-deep-seq-R	gtagtgaggaggagacccc (SEQ ID NO: 279)
OSTM1-AS1-deep-seq-F	aagcctccttccttcccaa (SEQ ID NO: 280)
OSTM1-AS1-deep-seq-R	atcgatacactccctagccca (SEQ ID NO: 281)
IL6-qPCR-F1	acaaattcggtacatcctcgac (SEQ ID NO: 282)
IL6-qPCR-R1	ttcagccatctttggaaggtt

	(SEQ ID NO: 283)
INF- β -qPCR-F1	acgccgcattgaccatctat (SEQ ID NO: 284)
INF- β -qPCR-R1	tagccaggagggttctcaaca (SEQ ID NO: 285)
GAPDH-F1	ggcatggactgtggcatgag (SEQ ID NO: 286)
GAPDH-R1	tgcaccaccaactgcttagc (SEQ ID NO: 287)
Репортер-1-qPCR-F	ccccgtaatgcagaagaagacc (SEQ ID NO: 288)
Репортер-1-qPCR-R	gtccttcagcttcagcctctg (SEQ ID NO: 289)
PPIB-qPCR-F	aacgcaacatgaaggtgctc (SEQ ID NO: 290)
PPIB-qPCR-R	accttgacggtgactttggg (SEQ ID NO: 291)
KRAS-qPCR-F	cagtgcaatgaggaccagt (SEQ ID NO: 292)
KRAS-qPCR-R	aggaccataggtacatcttcagag (SEQ ID NO: 293)
SMAD4-qPCR-F	cgaacgagttgtatcacctgga (SEQ ID NO: 294)
SMAD4-qPCR-R	cgatggctgtccctcaaagt (SEQ ID NO: 295)
FANCC-qPCR-F	agttgctctttcactcaaggtc (SEQ ID NO: 296)
FANCC-qPCR-R	ttctctctgagttcagacgct (SEQ ID NO: 297)
PPIB-deep-seq-F (AAG сайт)	tacacgacgctcttccgatcttaagtagagtgacacaggaggaaagagcatc (SEQ ID NO: 298)
PPIB-deep-seq-R (AAG сайт)	agacgtgtgctcttccgatcttaagtagaggcaccacctccatgccctc (SEQ ID NO: 299)
PPIB-deep-seq-F (CAG сайт)	tacacgacgctcttccgatcttaagtagagcatcgacagactgcggcaag

сайт)	(SEQ ID NO: 300)
PPIB-deep-seq-R (CAG сайт)	agacgtgtgctcttccgatcttaagtagagagtccatgggcctgtggaatgt (SEQ ID NO: 301)
FANCC-deep-seq-F2 (AAG/CAG сайт)	gaaaaactggcccgagagc (SEQ ID NO: 302)
FANCC-deep-seq-R2 (AAG/CAG сайт)	ctgagtctgggctgagggac (SEQ ID NO: 303)
IDUA-deep-seq-F	cgcttcagggtcaacaacac (SEQ ID NO: 304)
IDUA-deep-seq-R	ctcgcgtagatcagcaccg (SEQ ID NO: 305)
p53-deep-seq-F	cccctctgagtcaggaaacat (SEQ ID NO: 306)
p53-deep-seq-R	gaagatgacaggggccagg (SEQ ID NO: 307)
IFN- β -qPCR-F	tagcactggctggaatgag (SEQ ID NO: 308)
IFN- β -qPCR-R	gttctggaggtaacctgtaag (SEQ ID NO: 309)
ISG56-qPCR-F	tacagcaaccatgagtacaa (SEQ ID NO: 310)
ISG56-qPCR-R	tcagggtgttcacataggc (SEQ ID NO: 311)
ISG54-qPCR-F	ctgcaaccatgagtgagaa (SEQ ID NO: 312)
ISG54-qPCR-R	cctttgaggtgctttagatag (SEQ ID NO: 313)
IL-6-qPCR-F	gccctgagaaaggagacat (SEQ ID NO: 314)
IL-6-qPCR-R	ctgttctggagggtactctaggtat (SEQ ID NO: 315)
IL-8-qPCR-F	tttgaagagggtgagaa (SEQ ID NO: 316)
IL-8-qPCR-R	tgttctggatatttcattg

	(SEQ ID NO: 317)
RANTES-qPCR-F	catctgcctcccatattcc (SEQ ID NO: 318)
RANTES-qPCR-R	tccatcctagctcatctccaaa (SEQ ID NO: 319)
IL-12-qPCR-F	tgctccagaaggccagac (SEQ ID NO: 320)
IL-12-qPCR-R	ttcataaataactactaaggcacagg (SEQ ID NO: 321)
IL-1 β -qPCR-F	acagatgaagtgtccttcca (SEQ ID NO: 322)
IL-1 β -qPCR-R	gtcggagattcgtagctggat (SEQ ID NO: 323)
MCP1-qPCR-F	cattgtggccaaggagatctg (SEQ ID NO: 324)
MCP1-qPCR-R	cttcggagtttgggttgctt (SEQ ID NO: 325)
MIP1A-qPCR-F	catcacttgctgctgacacg (SEQ ID NO: 326)
MIP1A-qPCR-R	tgtggaatctgccgggag (SEQ ID NO: 327)
IP10-qPCR-F	ctgactctaagtggcatt (SEQ ID NO: 328)
IP10-qPCR-R	tgatggccttcgattctg (SEQ ID NO: 329)
GAPDH-qPCR-F2	cggagtcaacggatttggtcgta (SEQ ID NO: 330)
GAPDH-qPCR-R2	agccttctccatggtggtgaagac (SEQ ID NO: 331)

Продукты ПЦР очищали для секвенирования по Сэнгеру или NGS (Illumina HiSeq X Ten).

Глубокое секвенирование

[00216] Для экспериментов по редактированию эндогенной мРНК клетки 293T-WT высевали на 6-луночные планшеты (6×10^5 клеток/лунку). При примерно 70%

конфлюэнтности, клетки HEK293 трансфицировали 3 мкг dPHK с применением реагента для трансфекции ДНК X-tremeGENE HP (Roche). 72 часа спустя отсортированные GFP-положительные или BFP-положительные клетки (в соответствии с соответствующим маркером флуоресценции) с помощью FACS с последующим выделением РНК. Затем выделенную РНК подвергали обратной транскрипции в кДНК с помощью ПЦР с обратной транскрипцией и конкретный целевой генный локус амплифицировали с соответствующими парами праймеров (23 цикла ПЦР) и секвенировали на Illumina NextSeq.

Тестирование на нескольких клеточных линиях

[00217] Помимо клеток HEK293T (положительный контроль) и HEK293T ADAR1^{-/-} (отрицательный контроль), одна линия клеток мыши (NIH3T3), а также семь линий клеток человека (RD, HeLa, SF268, A549, HepG2, HT-29, SW13), происходящие из разных тканей и органов, были выбраны для проведения эксперимента. Для клеточных линий с более высокой эффективностью трансфекции на каждую лунку 12-луночного планшета высевали примерно $8-9 \times 10^4$ клеток (RD, HeLa, SF268) или $1,5 \times 10^5$ (HEK293T), как и для клеток (A549, HepG2, HT-29, SW13, NIH3T3), которые трудно трансфицировать, $2-2,5 \times 10^5$ клеток, высевали в 6-луночный планшет. И все эти клетки поддерживали в среде Игла, модифицированной Дульбекко (DMEM, Corning), с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки (FBS, CellMax) с 5% CO₂ при 37 °C. Через 24 часа репортер CG2 и плазмиду 71нт dPHK (35-C-35) котрансфицировали в клетки другого типа с помощью реагента для трансфекции ДНК X-tremeGENE HP (Roche). Через 48 часов после трансфекции клетки обрабатывали трипсином и анализировали с помощью FACS (BD). Поскольку в клетках с низкой эффективностью трансфекции было гораздо меньше mCherry и BFP-положительных клеток, увеличили общее количество клеток для анализа FACS до 1×10^5 для тех клеток, которые были помещены на 6-луночный планшет.

Анализ редактирования РНК для целевых сайтов

[00218] Для анализа глубокого секвенирования был создан индекс с применением последовательности целевого сайта (20 нуклеотидов выше и ниже) покрывающих последовательностей агРНК. Показания выравнивали и количественно определяли с применением BWA версии 0.7.10-r789. Затем BAM для выравнивания сортировали с помощью Samtools, а сайты редактирования РНК анализировали с помощью REDitools версии 1.0.4. Параметры следующие: -U [AG или TC] -t 8 -n 0,0 -T 6-6 -e -d -u. Все значимые преобразования A>G в области нацеливания агРНК, рассчитанные с помощью точного критерия Фишера (значение $p < 0,05$), считались отредактированными агРНК. Преобразования, за исключением целевого аденозина, считали нецелевыми редактированиями. Мутации, появившиеся одновременно в контрольной и

экспериментальной группой, рассматривали как SNP.

Анализ секвенирования РНК в масштабе всего транскриптома

[00219] Плазмиды, экспрессирующие Ctrl РНК₁₅₁ или arРНК₁₅₁-PPIB с кассетой экспрессии BFP, трансфицировали в клетки HEK293T. Клетки BFP⁺ обогащали с помощью FACS через 48 часов после трансфекции, и РНК очищали с помощью набора RNeasy Pure Micro (TIANGEN, DP420). Затем мРНК очищали с применением модуля магнитной изоляции мРНК NEBNext Poly(A) (New England Biolabs, E7490), обрабатывали с помощью набора для подготовки библиотеки РНК NEBNext Ultra II для Illumina (New England Biolabs, E7770) с последующим анализом глубокого секвенирования с применением платформы Illumina HiSeq X Ten (парный конец 2×150 пар оснований, 30G для каждого образца). Чтобы исключить неспецифический эффект, вызванный трансфекцией, авторы изобретения включили контрольную группу, в которой клетки обрабатывали только реагентом для трансфекции. Каждая группа включала четыре повтора.

[00220] Линия биоинформатического анализа упомянута в работе Vogel и соавт.²². Контроль качества анализа проводили с применением FastQC, а качественное усечение было основано на Cutadapt (первые 6 пар оснований для каждого считывания были обрезаны, и до 20 пар оснований были обрезаны по качеству). Скрипты AWK применяли для фильтрации введенных arРНК. После усечения, считывания длиной менее 90 нт отфильтровывали. Впоследствии отфильтрованные считывания были сопоставлены с эталонным геномом (GRCh38-hg38) с помощью программного обеспечения STAR⁶¹. Авторы изобретения применяли GATK Haplotypecaller⁶² для определения вариантов. Необработанные файлы VCF, созданные GATK, были отфильтрованы и аннотированы GATK VariantFiltration, bcftools и ANNOVAR⁶³. Варианты в dbSNP, 1000 Genome⁶⁴, EVS были отфильтрованы. Затем общие варианты в четырех повторах каждой группы были выбраны в качестве сайтов редактирования РНК. Уровень редактирования РНК контрольной группы рассматривали как фон, а общие мишени Ctrl РНК₁₅₁ и arРНК₁₅₁-PPIB получали путем вычитания вариантов в контрольной группе.

[00221] Чтобы оценить, нарушает ли LEAPER естественный гомеостаз редактирования, проанализировали глобальные сайты редактирования, общие для контрольной группы и группы arРНК₁₅₁-PPIB (или группы Ctrl РНК₁₅₁). Дифференциальную скорость редактирования РНК на нативных сайтах редактирования A-в-I оценивали с помощью анализа коэффициентов корреляции Пирсона. Корреляции Пирсона скорости редактирования между контрольной группой и группой arРНК₁₅₁-PPIB (или группой Ctrl РНК₁₅₁) рассчитаны и показаны на фиг. 6.

$$[00222] \rho(X, Y) = \frac{E[(X - \mu_X)(Y - \mu_Y)]}{\sigma_X \sigma_Y},$$

[00223] X означает скорость редактирования каждого сайта в контрольной группе, Y означает скорость редактирования каждого сайта в группе Ctrl РНК₁₅₁ (фиг. 6a) или группе arРНК₁₅₁-РРІВ (фиг. 6b), σ_X представляет собой стандартное отклонение X, σ_Y представляет собой стандартное отклонение Y, μ_X представляет собой среднее значение X, μ_Y представляет собой среднее значение Y, E представляет собой ожидаемое значение.

[00224] Данные секвенирования РНК анализировали для исследования возможных изменений транскрипции, вызванных событиями редактирования РНК. Анализ экспрессии генов в масштабе транскриптома проводили с применением программ HISAT2 и STRINGTIE⁶⁵. Авторы изобретения применяли Cutadapt и FastQC для контроля качества данных секвенирования. Затем данные секвенирования сопоставили с эталонным геномом (GRCh38-hg38) с применением HISAT2 с последующим анализом коэффициента корреляции Пирсона, как упомянуто выше.

Вестерн-блоттинг

[00225] Авторы изобретения применяли моноклональные первичные антитела мыши соответственно против ADAR1 (Santa Cruz, sc-271854), ADAR2 (Santa Cruz, sc-390995), ADAR3 (Santa Cruz, sc-73410), p53 (Santa Cruz, sc-99), KRAS (Sigma, SAB1404011), GAPDH (Santa Cruz, sc-47724) и β -тубулина (CWBioTech, CW0098). Вторичное антитело козы к IgG мыши (H+L, 115-035-003), конъюгированное с пероксидазой хрена, приобретали у Jackson ImmunoResearch. 2×10^6 клеток отсортировали для лизирования, и равное количество каждого лизата загружали для электрофореза в полиакриламидном геле. Затем образцы белков переносили на PVDF(поливинилиденфторид)-мембрану (Bio-Rad Laboratories) и проводили иммуноблоттинг с первичными антителами против одного из ферментов ADAR (анти-ADAR1, 1:500, анти-ADAR2, 1:100, анти-ADAR3, 1:800) с последующей инкубацией вторичных антител (1:10000) и воздействием. β -Тубулин повторно исследовали на той же PVDF-мембране после удаления белков ADAR с помощью буфера для удаления (CWBioTech, CW0056). Эксперименты повторяли трижды. Полуколичественный анализ выполняли с помощью программного обеспечения Image Lab.

Анализ экспрессии цитокинов

[00226] Клетки НЕК293Т высевали на 12-луночные планшеты (2×10^5 клеток/лунку). При примерно 70% конфлюэнтности, клетки трансфицировали 1,5 мкг arРНК. В качестве положительного контроля трансфицировали 1 мкг поли(I:C) (Invitrogen, tlrl-picw). Спустя 48 часов клетки собирали и подвергали выделению РНК (TIANGEN, DP430). Затем общую РНК подвергали обратной транскрипции в кДНК с помощью ПЦР с обратной транскрипцией (TIANGEN, KR103-04), а экспрессию IFN- β и IL-6 измеряли с помощью

количественной ПЦР (TAKARA, RR820A). Последовательности праймеров перечислены в таблице 1.

Анализ транскрипционной регуляторной активности p53

[00227] Плазмиды, экспрессирующие кДНК TP53^{W53X}, и плазмиды, экспрессирующие агРНК, котрансфицировали в клетки HEK293T TP53^{-/-} вместе с цис-репортерными плазмидами p53-люцифераза Firefly (YRGene, VXS0446) и плазмидами люцифераза Renilla (подарок лаборатории Z. Jiang, Пекинский университет) для обнаружения транскрипционной регуляторной активности p53. Через 48 часов клетки собирали и анализировали с помощью системы анализа люциферазы Promega Dual-Glo (Promega, E4030) в соответствии с протоколом производителя. Кратко, 150 мкл реагента Dual-Glo Luciferase добавляли к осадку собранных клеток, и через 30 минут люминесценцию Firefly измеряли, добавляя 100 мкл реагента Dual-Glo Luciferase (клеточный лизис) в 96-луночный белый планшет, с помощью ридера Infinite M200 (TECAN). 30 мин спустя последовательно добавляли 100 мкл реагентов Dual-Glo stop и Glo Reagent в каждую лунку для измерения люминесценции Renilla и расчета отношения люминесценции Firefly к люминесценции Renilla.

Электропорация в первичных клетках

[00228] Для электропорации плазмид, экспрессирующих агРНК, в первичных легочных фибробластах человека или первичных бронхиальных эпителиальных клетках человека 20 мкг плазмид подвергали электропорации с помощью устройства NucleofectorTM 2b (Lonza) и набора Basic NucleofectorTM (Lonza, VPI-1002) и программы электропорации U-023. Для электропорации плазмид, экспрессирующих агРНК, в первичных Т-клетках человека 20 мкг плазмид подвергали электропорации в первичные Т-клетки человека с помощью устройства NucleofectorTM 2b (Lonza) и набора NucleofectorTM для Т-клеток человека (Lonza, VPA-1002), и программы электропорации T-024. Через 48 часов после электропорации клетки сортировали и собирали с помощью анализа FACS, а затем подвергали последующему глубокому секвенированию для анализа целевого редактирования РНК. Эффективность электропорации нормировали по флуоресцентному маркеру.

[00229] Для электропорации хемосинтетической агРНК или контрольной РНК в первичных Т-клетках человека или первичных клетках GM06214 олиго РНК растворяли в 100 мкл среды орti-MEM (Gibco, 31985070) с конечной концентрацией 2 мкМ. Затем клетки 1×10E6 GM06214 или 3×10E6 Т-клетки ресуспендировали в указанной выше смеси для электропорации и подвергали электропорации с помощью устройства Agile Pulse In Vivo (BTX) при 450 В в течение 1 мс. Затем клетки переносили в теплую культуральную среду

для следующих анализов.

Анализ каталитической активности α -L-идуронидазы (IDUA)

[00230] Осадок собранных клеток ресуспендировали и лизировали 28 мкл 0,5% Triton X-100 в 1×PBS буфере на льду в течение 30 минут. А затем 25 мкл лизиса клеток добавляли к 25 мкл 190 мкМ субстрата 4-метилумбеллиферил- α -L-идуронидазы (Cayman, 2A-19543-500), который растворяли в 0,4 М натрийформатном буфере, содержащем 0,2% Triton X-100, pH 3,5, и инкубировали в течение 90 минут при 37 °C в темноте. Каталитическую реакцию гасили добавлением 200 мкл 0,5 М NaOH/глицинового буфера, pH 10,3, а затем центрифугировали в течение 2 минут при 4 °C. Супернатант переносили в 96-луночный планшет и измеряли флуоресценцию при длине волны возбуждения 365 нм и длине волны эмиссии 450 нм с помощью считывающего устройства Infinite M200 (TECAN).

Пример 1. Тестирование способа редактирования РНК по настоящему изобретению на репортере.

[00231] Сообщалось, что белки семейства Cas13 (C2c2) могут редактировать РНК в клетках млекопитающих. Авторы изобретения дополнительно протестировали эту систему в различных условиях. Во-первых, авторы изобретения сконструировали репортерную систему с двойственной флуоресценцией, основанную на флуоресценции mCherry и EGFP, путем введения 3×GS линкерной нацеливающей последовательности, содержащей стоп-кодон, между mCherry и геном EGFP. Кроме того, удалили стартовый кодон ATG EGFP, чтобы уменьшить блокирование трансляции EGFP.

[00232] Репортер-1 двойственной флуоресценции содержит последовательность mCherry (SEQ ID NO: 1), последовательность, содержащую 3×GS линкер и целевой A (SEQ ID NO: 2), и последовательность eGFP (SEQ ID NO: 3).

atgggtgagcaagggcgaggaggataacatggccatcatcaaggagttcatgcgcttcaaggtgcacatggagggctccgtga
acggccacgagttcgagatcgagggcgagggcgagggcgccctacgagggcacccagaccgccaagctgaaggtgaccaagggt
ggccccctgcccttcgctgggacatcctgtcccctcagttcatgtacggctccaaggcctacgtgaagcacccccgccgacatccccgact
actgaagctgtccttccccgagggcttcaagtgggagcgcgtgatgaacttcgaggacggcggcgtggtgaccgtgacccaggactcct
ccctgcaggacggcgagttcatctacaaggtgaagctgcgcggcaccaactcccctccgacggccccgtaatgcagaagaagacatg
ggctgggaggcctcctccgagcggatgtaccccgaggacggcgccctgaagggcgagatcaagcagaggctgaagctgaaggacgg
cggccactacgacgtgaggtcaagaccacctacaaggccaagaagcccgtgcagctgcccggcgccctacaacgtcaacatcaagttgg
acatcacctcccacaacgaggactacaccatcgtggaacagtacgaacgcgccgagggccgcccactccaccggcgccatggacgagct
gtacaag (последовательность mCherry) (SEQ ID NO: 1)

ctgcagggcgaggaggcagcggcgaggaggcagcggcgaggaggcagcagaaggtatacacgccggaagaatctgtagag
atccccggtcgccacc

(последовательность, содержащая 3×GS линкер (выделены курсивом и полужирным

шрифтом) и целевой А (показан жирным шрифтом А)) (SEQ ID NO:2)

dC2c2-ADARDD, белок EGFP экспрессируется в значительной степени. Например, направляющая crPHK с последовательностью: ggaccassssaaaaaugaauuaaassaaaacugaacagcussucgsssiugciscasuggcagagccssicagcaucgscgagcag gscgucgssicussicussicussicussicussicusscgss (SEQ ID NO: 6) дает EGFP-положительную эффективность, превышающую 25 %. Это показывает, что аденин в стоп-кодоне UAG в значительной степени отредактирован. Напротив, случайная crPHK не могла превратить EGFP-отрицательные клетки в положительные (фиг. 6A, 6B и 6C). Основываясь на этих результатах, авторами изобретения сделан вывод, что сверхэкспрессия одного только транскрипта РНК может заставить эндогенный фермент ADAR редактировать РНК.

[00236] Кроме того, авторы изобретения удалили последовательность каркаса РНК на направляющих РНК, с получением линейной направляющей РНК. Авторы изобретения обнаружили, что РНК длиной 70 нуклеотидов (aaaccgaggggaucauaggggacugaauccassaaucsiucissssaauccsigsaacissuicuiucssscugc (SEQ ID NO: 7)), комплементарная целевой РНК с ошибкой спаривания А-С, может эффективно преобразовывать EGFP-отрицательные клетки в EGFP-положительные клетки, в то время как случайная РНК длиной 70 нуклеотидов (ugaacagcussucgsssiugciscasuggcagagccssicagcaucgscgagcaggcscgucgssicussicgss (SEQ ID NO: 8)) не может (фиг. 1A, 1B, 1C и 1D). Таким образом, такая РНК обозначена как dPHK (РНК, рекрутирующая дезаминазу). Чтобы проверить, что клеточный эндогенный ADAR может быть рекрутирован для проведения дезаминирования аденина с помощью dPHK, проведены эксперименты на клеточных линиях 293Т с двойным нокаутом ADAR1 p110 и ADAR1 p150 (фиг. 6E и 6F), поскольку ADAR1 экспрессируется повсеместно, в то время как ADAR2 в основном экспрессируется на высоком уровне в головном мозге. Таким образом, авторы изобретения предположили, что целевое дезаминирование аденина с помощью dPHK в основном опосредовано ADAR1, но не ADAR2. Как и ожидалось, нацеливающая dPHK не могла запускать экспрессию EGFP в клетках 293Т-ADAR1^{-/-}, но избыточная экспрессия либо экзогенного ADAR1, p110, p150, либо ADAR2 могла восстанавливать экспрессию EGFP в клетках 293Т-ADAR1^{-/-} (Фиг. 1E и 1F), что указывает на то, что в клетках 293Т dPHK может рекрутировать ADAR1 или ADAR2 для опосредования дезаминирования аденина на целевой РНК. Более того, авторами изобретения обнаружено, что ADAR1-p110 и ADAR2 обладают более высокой активностью редактирования, чем ADAR1-p150 (фиг. 1G и фиг. 6G), что возможно из-за различной клеточной локализации ADAR1-p110 и ADAR1-p150.

[00237] Чтобы определить, что восстановление флуоресценции EGFP произошло из-за событий редактирования нацеливающей РНК, авторы изобретения непосредственно измеряли dPHK-опосредованное редактирование транскриптов Репортера-2 с помощью

ПЦР с обратной транскрипцией с последующим целевым секвенированием по Сэнгеру и секвенированием следующего поколения. Результаты секвенирования показали преобразование оснований А в Г в целевом аденине (сайт ошибки спаривания А-С), и скорость редактирования могла достигать 13 % (фиг. 6Н и фиг. 1Н). Кроме того, также наблюдали небольшое редактирование А в Г во время окон последовательностей рядом с целевым аденином, скорее всего, из-за увеличения дуплексных областей РНК, позже авторы изобретения попытаются избавиться от неожиданного редактирования с помощью нескольких стратегий.

Пример 2. Оптимизация факторов для конструирования dРНК.

[00238] Затем авторы изобретения приступили к оптимизации dРНК для достижения более высокой эффективности редактирования. Во-первых, авторы изобретения стремились определить, какое основание в сайте, противоположном целевому аденину, благоприятствует редактированию. Предыдущие исследования показали, что противоположное основание для целевого аденозина влияет на эффективность редактирования. Таким образом, сконструирована dРНК из 71 нуклеотида с ошибкой спаривания N (А, U, С и G) в среднем положении, противоположном целевому А. На основе результатов FACS было обнаружено, что четыре различных dРНК редактируются эффективно следующим образом: C>A>U>G (Фиг.2А и 2В). Недавно сообщалось, что небольшой пузырек на целевом сайте UAG может быть полезен для эффективности редактирования. Поэтому были разработаны dРНК, содержащие два или три ошибочно спаренных основания с целевым сайтом UAG, чтобы проверить настоящую гипотезу. С помощью способа клонирования «золотые ворота» (Golden Gate) были сконструированы и разработаны 16 различных dРНК из 71 нуклеотидов в векторе dРНК с маркером BFP. Было обнаружено, что dРНК с последовательностями CCA и GCA имеют самую высокую эффективность, что означает, что маленький пузырек мало способствует редактированию А-И, по меньшей мере в случае целевого сайта UAG. Кроме того, четыре dРНК последовательности NCA имеют более высокий процент GFP-положительных клеток, что позволяет сделать вывод, что комплементарная пара оснований U-A может быть важной для редактирования ADAR (фиг. 2С и 2D). Авторы изобретения затем проверили эффективность dРНК разной длины на основе Репортера. Были сконструированы dРНК с ошибкой спаривания С в среднем положении с различной длиной в диапазоне от 31 до 221 нуклеотида. Авторами изобретения было обнаружено, что эффективность редактирования увеличивается с более длинной dРНК. Пик редактирования репортерной системы находится на 171 нуклеотиде dРНК. dРНК из 51 нуклеотида (51nt dRNA) могла осветить репортерную систему с хорошей эффективностью (18 %) (фиг. 2Е и 2F). Наконец, авторы

изобретения исследовали, влияет ли положение ошибочно спаренного С dРНК на эффективность редактирования. Для dРНК сохраняли такую же длину 71 нт, сконструировали ошибку спаривания С в положении, отличном от начала транскрипции. Основываясь на результатах FACS, авторами изобретения было обнаружено, что положение противоположной ошибки спаривания С может влиять на эффективность редактирования, а ошибка спаривания С, расположенная в 5' или 3' dРНК, имеет меньшую эффективность (фиг. 2G и 2H).

[00239] 16 различных репортеров, содержащих целевые последовательности, содержащие все возможные мотивы из 3 оснований, были сконструированы посредством клонирования Гибсона, а затем клонированы в каркас pLenti (pLenti-CMV-MCS-SV-Bsd, Лаборатория Стэнли Коэна, Стэнфордский университет). Целевые последовательности показаны ниже.

Целевые последовательности, содержащие все возможные 3 основных мотива:

TAT:

atggacgagctgtacaagctgcagggcggaggaggcagcgctgctcgcatgctatagggctctgccagtgagcaagggc
gaggagctgttcaccggggtggtgcccatc (SEQ ID NO: 9)

TAA:

atggacgagctgtacaagctgcagggcggaggaggcagcgctgctcgcatgctaaagggtctgccagtgagcaagggc
gaggagctgttcaccggggtggtgcccatc (SEQ ID NO: 10)

TAC:

atggacgagctgtacaagctgcagggcggaggaggcagcgctgctcgcatgctacagggtctgccagtgagcaagggc
gaggagctgttcaccggggtggtgcccatc (SEQ ID NO: 11)

TAG:

atggacgagctgtacaagctgcagggcggaggaggcagcgctgctcgcatgctagagagggtctgccagtgagcaag
ggcaggagctgttcaccggggtggtgcccatc (SEQ ID NO: 12)

AAT:

atggacgagctgtacaagctgcagggcggaggaggcagcgctgctcgcatgcaatagggtctgccagtgagcaagggc
gaggagctgttcaccggggtggtgcccatc (SEQ ID NO: 13)

AAA:

atggacgagctgtacaagctgcagggcggaggaggcagcgctgctcgcatgcaaaagggtctgccagtgagcaaggg
cgaggagctgttcaccggggtggtgcccatc (SEQ ID NO: 14)

AAC:

atggacgagctgtacaagctgcagggcggaggaggcagcgctgctcgcatgcaacagggtctgccagtgagcaaggg
cgaggagctgttcaccggggtggtgcccatc (SEQ ID NO: 15)

AAG:

atggacgagctgtacaagctgcagggcggaggaggcagcgctgctcgcatgcaagagggctctgccagtgagcaaggg
cgaggagctgttcacgggggtggtgcccatc (SEQ ID NO: 16)

CAT:

atggacgagctgtacaagctgcagggcggaggaggcagcgctgctcgcatgccatagggctctgccagtgagcaagggc
gaggagctgttcacgggggtggtgcccatc (SEQ ID NO: 17)

CAA:

atggacgagctgtacaagctgcagggcggaggaggcagcgctgctcgcatgccaagggctctgccagtgagcaaggg
cgaggagctgttcacgggggtggtgcccatc (SEQ ID NO: 18)

CAC:

atggacgagctgtacaagctgcagggcggaggaggcagcgctgctcgcatgccacagggctctgccagtgagcaaggg
cgaggagctgttcacgggggtggtgcccatc (SEQ ID NO: 19)

CAG:

atggacgagctgtacaagctgcagggcggaggaggcagcgctgctcgcatgccagagggctctgccagtgagcaaggg
cgaggagctgttcacgggggtggtgcccatc (SEQ ID NO: 20)

GAT:

atggacgagctgtacaagctgcagggcggaggaggcagcgctgctcgcatgcgatagggctctgccagtgagcaaggg
cgaggagctgttcacgggggtggtgcccatc (SEQ ID NO: 21)

GAA:

atggacgagctgtacaagctgcagggcggaggaggcagcgctgctcgcatgcgaaagggctctgccagtgagcaaggg
cgaggagctgttcacgggggtggtgcccatc (SEQ ID NO: 22)

GAC:

atggacgagctgtacaagctgcagggcggaggaggcagcgctgctcgcatgcgacagggctctgccagtgagcaaggg
cgaggagctgttcacgggggtggtgcccatc (SEQ ID NO: 23)

GAG:

atggacgagctgtacaagctgcagggcggaggaggcagcgctgctcgcatgcgagagggctctgccagtgagcaaggg
cgaggagctgttcacgggggtggtgcccatc (SEQ ID NO: 24)

[00240] Для dPHK сохраняли такую же длину 111 п.н. и создавали ошибку спаривания С в центре по направлению к целевому А.

[00241] В 12-луночном кластере клеточных культур 2×10^5 клеток HEK293Т помещали в каждую лунку, и каждый эксперимент проводили в трех повторах. Через 24 часа 0,5 мкг плазмиды dPHK и 0,5 мкг репортерной целевой плазмиды котрансфицировали в клетки с применением реагента для трансфекции ДНК X-tremeGENE HP (Roche). Через 48 часов клетки обрабатывали трипсином и отбирали на mCherry-положительные клетки с помощью FACS (BD). Всего было собрано 4×10^5 клеток, и общую РНК экстрагировали с применением набора для чистых клеток/бактерий RNeasy (TIANGEN DP430). кДНК

синтезировали из 2 мкг общей РНК с применением Quantscript RT Kit (TIANGEN KR103-04). 111 целевых областей амплифицировали с помощью ПЦР и отправляли на глубокое секвенирование.

[00242] Авторами изобретения было обнаружено, что все 16 различных мотивов из трех оснований можно редактировать с помощью иллюстративного способа редактирования РНК по настоящему изобретению, хотя и с переменной эффективностью. В итоге результаты показывают, что 5' ближайший сосед А, подлежащего редактированию, имеет предпочтение $U > C \approx A > G$, а 3' ближайший сосед А, подлежащего редактированию, имеет предпочтение $G > C > A \approx U$. Данные представлены в виде гистограммы на фиг. 3А или тепловой карты на фиг. 3В.

Пример 3. Редактирование РНК, транскрибируемой из эндогенных генов.

[00243] Затем было проверено, может ли dPHK опосредовать мРНК, транскрибируемую из эндогенных генов. Авторами настоящего изобретения разработана dPHK, нацеленная на четыре гена KRAS, PPIB, β-актин и GAPDH. Для мРНК KRAS сконструированы dPHK длиной 91, 111, 131, 151, 171 и 191 нуклеотидов (фиг. 4А) с последовательностями, показанными ниже.

91-нуклеотидная (91-nt) KRAS-dPHK

uagcuguaucgucuaaggcacucuuugccuacgccaccagcuccaaccaccasaaguuuauuuucagucuuuuucagcaggccucucucuccgc (SEQ ID NO: 25)

111-нуклеотидная (111-nt) KRAS-dPHK

gauucugaaauagcuguaucgucuaaggcacucuuugccuacgccaccagcuccaacuaccasaaguuuauuuucagucuuuuucagcaggccucucucuccgcaccugggagc (SEQ ID NO: 26)

131-нуклеотидная (131-nt) KRAS-dPHK

uaccasaaaugaauucugaauuagcuguaucgucuaaggcacucuuugccuacgccaccagcuccaacuaccasaaguuuauucagucuuuuucagcaggccucucucuccgcaccugggagccgcugagccu (SEQ ID NO: 27)

151-нуклеотидная (151-nt) KRAS-dPHK

ausauucguccasaaaugaauucugaauuagcuguaucgucuaaggcacucuuugccuacgccaccagcuccaaccaccasaaguuuauuuucagucuuuuucagcaggccucucucuccgcaccugggagccgcugagagccucuggcccccgc (SEQ ID NO: 28)

171-нуклеотидная (171-nt) KRAS-dPHK

cuauuuguggaucuuuuucguccasaaaugaauucugaauuagcuguaucgucuaaggcacucuuugccuacgccaccagcuccaaccaccasaaguuuauuuucagucuuuuucagcaggccucucucuccgcaccugggagccgcugagccucuggcccccgcgcccgcuuuc (SEQ ID NO: 29)

191-нуклеотидная (191-nt) KRAS-dPHK

uaggaauccucuauuuguggaucuuuuucguccasaaaugaauucugaauuagcuguaucgucuaaggcacucuuug

редактировать мРНК β-актина как в сайте1, так и сайте2, с эффективностью редактирования до 1,4 % для каждого сайта (фиг. 4Н и фиг. 8А). Авторами настоящего изобретения также обнаружено, что более длинные dРНК обеспечивали более высокую эффективность редактирования: 0,6 % для dРНК-71нт (dРНК-71nt) и 1,4 % для dРНК-131нт (dРНК-131nt) (фиг. 3Н). Для другого гена домашнего хозяйства, GAPDH, применяли 71нт (71nt) dРНК (саaggugcggcсиссggccссиссиссиусаaggggуссасаugggсаасугaggaggggагаиисагуг (SEQ ID NO: 37)), и эффективность редактирования составила 0,3 %, возможно, из-за короткой длины dРНК (фиг. 8В).

Пример 4. Нецелевой анализ по иллюстративному способу LEAPER.

[00245] Для терапевтического применения точность редактирования имеет решающее значение. Авторы настоящего изобретения попытались охарактеризовать специфичность иллюстративной системы редактирования РНК по настоящему изобретению. Был выбран эндогенный сайт 1 РРІВ и сайт KRAS для анализа. Для сайта 1 РРІВ можно видеть во время покрытых dРНК областей, что было несколько оснований А, фланкирующих целевой А76, таких как А22, А30, А33, А34, А39, А49, А80, А91, А107 и А140. Он показал, что эти фланкирующие основания А практически не редактировались, в то время как целевое основание А76 (ошибка спаривания А-С) показывало эффективность редактирования до 14 % (фиг. 5А и 5В).

[00246] Что касается сайта KRAS, можно видеть в покрытой dРНК области, что существует много аденинов, фланкирующих целевое основание А56, до 29 фланкирующих оснований А. Из результатов редактирования мРНК KRAS было обнаружено, что, хотя целевое основание А56 (ошибка спаривания А-С) показало эффективность редактирования до 11,7 %, фланкирующий аденин можно было редактировать (фиг. 5С и 5D). Были отредактированы различные нецелевые аденины, в то время как аденины, такие как А41, А43, А45, А46, А74, А79, подверглись большему редактированию. Авторами изобретения было обнаружено, что 5' ближайшим соседом этих неотредактированных оснований А были G или C, тогда как 5' ближайшим соседом эффективно отредактированных аденинов были T или A. Основываясь на этом наблюдении, было решено разработать dРНК для минимизации нецелевого редактирования аденинов, подверженных редактированию. В настоящем исследовании было обнаружено, что ADAR предпочитает ошибку спаривания А-С по сравнению с А-А, А-U, и ошибка спаривания А-G была наименее предпочтительной. Таким образом, было предположено, что для нецелевых оснований А, для которых 5' ближайший сосед представлял собой U или A, ошибка спаривания А-G могла бы уменьшить или ослабить нецелевые эффекты. Предыдущее исследование показало, что ошибка спаривания А-G может блокировать редактирование дезаминирования с помощью

ADAR.

[00247] Затем авторы изобретения разработали три вида вариантов dPHK из 91 нуклеотидов (91-nt) и четыре вида вариантов dPHK из 111 нуклеотидов (111-nt) (с последовательностями, показанными ниже), содержащих различные комбинации ошибок спаривания A-G, на основе статистических результатов на фиг. 5D и существующих знаний: dPHK-AG1 (A41, A46, A74), dPHK-AG2 (A41, A43, A45, A46, A74, A79), dPHK-AG3 (A31, A32, A33, A41, A43, A45, A46, A47, A74, A79), dPHK-AG4 (A7, A31, A32, A33, A40, A41, A43, A45, A46, A47, A74, A79, A95) (фиг. 4E).

KRAS-dPHK-91-AG2

UAGCUGUAUCGUCAAGGCACUCgUGCCgACGCCACCAGCUCCAACcACCACA
AGgggAgAgUCAGUCAgggUCAGCAGGCCUCUCUCCCCGC (SEQ ID NO: 38)

KRAS-dPHK-91-AG3

UAGCUGUAUCGUCAAGGCACUCUUGCCgACGCCACCAGCUCCAACcACCACA
AGUgUAUAgUCAGUCAUUUUCAGCAGGCCUCUCUCCCCGC (SEQ ID NO: 39)

KRAS-dPHK-91-AG4

UAGCUGGAUCGUCAAGGCACUCGUGCCGACGCCACCAGCUCCAACCACCAC
AAGGGGAGAGGCAGUCAGGGUCAGCAGGCCUCUCUCCCCGC (SEQ ID NO: 40)

KRAS-dPHK-111-AG1

GAUUCUGAAUUAGCUGUAUCGUCAAGGCACUCUUGCCgACGCCACCAGCUC
CAACcACCACAAGUgUAUAgUCAGUCAUUUUCAGCAGGCCUCUCUCCCCGCACCUGG
GAGC (SEQ ID NO:41)

KRAS-dPHK-111-AG2

GAUUCUGAAUUAGCUGUAUCGUCAAGGCACUCgUGCCgACGCCACCAGCUC
CAACcACCACAAGUggAgAgUCAGUCAUUUUCAGCAGGCCUCUCUCCCCGCACCUGGG
AGC (SEQ ID NO:42)

KRAS-dPHK-111-AG3

GAUUCUGAAUUAGCUGUAUCGUCAAGGCACUCgUGCCgACGCCACCAGCUC
CAACcACCACAAGgggAgAgUCAGUCAgggUCAGCAGGCCUCUCUCCCCGCACCUGGGA
GC (SEQ ID NO:43)

KRAS-dPHK-111-AG4

GCUCCCCGGUGCGGGAGAGAGGCCUGCUGACCCUGACUGCCUCUCCCCUUG
UGGUGGUUGGAGCUGGUGGCGUCGGCACGAGUGCCUUGACGAUCCAGCUAAUUC
AGAAUC (SEQ ID NO: 44)

[00248] Затем указанными dPHK трансфицировали клетки HEK293T, и пустой вектор и 71-нуклеотидную (71-nt) контрольную dPHK, не направленную на нацеливание:

(tctcagtccaatgtatgggtccgagcacaagctctaatacaagtcgcggggtgtagaccggttgccatagga (SEQ ID NO: 45)) применяли в качестве отрицательного контроля. Для dPHK из 91 нуклеотида (91-nt) результаты глубокого секвенирования показали, что редактирование на мишени (A56) было снижено до 2,8 % для dPHK-91-AG2, 2,3 % для dPHK-91-AG3 и 0,7 % для dPHK-91-AG4, по сравнению с эффективностью редактирования на мишени (A56) 7,9 % для dPHK-91 без ошибки спаривания A-G (фиг. 4F). Для dPHK из 91 нуклеотидов редактирование на мишени (A56) было снижено до 5,1 % для dPHK-111-AG2 и 4,9 % для dPHK-111-AG3 по сравнению с эффективностью редактирования на мишени (A56) 15,1 % для dPHK-111 без ошибки спаривания A-G (фиг. 4F), что указывает на то, что более длинная dPHK может нести больше ошибок спаривания A-G. Затем авторы изобретения выбрали 111-нуклеотидную (111-nt) dPHK для подробного нецелевого анализа. Редактирование фланкирующих оснований A было резко сведено на нет, за исключением A7 и A79 (фиг. 4G). Для основания A7 нецелевой эффект может быть предотвращен с помощью дальнейшего дизайна ошибок спаривания A-G на этом сайте, который отсутствует в текущем дизайне dPHK. Для основания A79 введение двух соседних ошибок спаривания A-G A78/A79 может помочь устранить нецелевые эффекты. Основываясь на таких результатах, применение систем редактирования РНК настоящей заявки для лечения генетических заболеваний является очень многообещающим и обнадеживающим.

Пример 5. Тестирование типичного способа LEAPER на нескольких клеточных линиях.

[00249] Основываясь на результатах на клетках HEK293T, авторы изобретения предположили, что двухцепочечная РНК, образованная линейной dPHK и ее целевой РНК, может рекрутировать эндогенный белок ADAR для редактирования A-I. Чтобы подтвердить гипотезу, выбрали больше клеточных линий для тестирования способа редактирования РНК по настоящему изобретению. Результаты показаны на фиг. 9. Указанные результаты на множестве клеточных линий доказали универсальность способа редактирования РНК по настоящему изобретению. Во-первых, несмотря на различную эффективность редактирования, применение dPHK для рекрутирования эндогенного ADAR было подходящим для множества клеточных линий человека, происходящих из 7 различных тканей и органов. Кроме того, указанный способ может работать не только на клетках человека, но и на клетках мыши, что дает возможность проводить эксперименты на мышах.

Пример 6. Применение эндогенного ADAR для редактирования РНК.

[00250] В попытке исследовать эффективную платформу редактирования РНК был слит деаминазный домен гиперактивного мутанта E1008Q ADAR1 (ADAR1_{DD})⁴⁰ с

каталитически неактивным LbuCas13 (dCas13a), управляемым РНК эффектором CRISPR, нацеленным на РНК⁴¹ (фиг. 10А). Чтобы оценить эффективность редактирования РНК, был сконструирован суррогатный репортер, несущий гены mCherry и EGFP, связанные последовательностью, содержащей область, кодирующую 3×GGGGS, и стоп-кодон UAG в рамке считывания (Репортер-1, фиг. 10В). Клетки, трансфицированные репортером, экспрессировали только белок mCherry, в то время как целевое редактирование UAG репортерного транскрипта могло преобразовать стоп-кодон в UIG и, следовательно, разрешить последующую экспрессию EGFP. Такой репортер позволяет измерять эффективность редактирования А в I посредством мониторинга уровня EGFP. Затем авторы изобретения сконструировали управляемые промотором hU6 crРНК (CRISPR РНК), содержащие 5'-каркасы, подверженные распознаванию Cas13a, и спейсерные последовательности переменной длины для нацеливания (crРНК^{Cas13a}, следующие за последовательностями crРНК LbuCas13).

[00251] Таблица 2. Последовательности crРНК LbuCas13

Наименование	Последовательность	Источник
LbuCas13/Cas13a crРНК каркас	ggaccacccccaaaaugaaggggacuaaaac (SEQ ID NO: 46)	ФИГ. 10
Ctrl crРНК ₇₀	aaaccgaggggaucuaaggggacugaauccaccuucucucucccauuccu gcaacucucucucucuccugc (SEQ ID NO: 47)	ФИГ. 10
Спейсер crРНК ₁₅	gcagagccucCagc (SEQ ID NO: 48)	ФИГ. 10
Спейсер crРНК ₂₂	cucacuggcagagccucCagc (SEQ ID NO: 49)	ФИГ. 10
Спейсер crРНК ₂₈	cccuugcucacuggcagagccucCagc (SEQ ID NO: 50)	ФИГ. 10
Спейсер crРНК ₃₅	cucucgcccucgucacuggcagagccucCagc (SEQ ID NO: 51)	ФИГ. 10
Спейсер crРНК ₄₀	cucucgcccucgucacuggcagagccucCagcaucgc (SEQ ID NO: 52)	ФИГ. 10
Спейсер crРНК ₄₇	ugaacagcucucgcccucgucacuggcagagccucCagcaucgc (SEQ ID NO: 53)	ФИГ. 10
Спейсер crРНК ₇₀	ugaacagcucucgcccucgucacuggcagagccucCagcaucgcga gcaggcgucgcccucuccgcgc	ФИГ. 10

	(SEQ ID NO: 54)	
--	-----------------	--

[00252] Последовательности, комплементарные транскриптам-мишеням, все содержат ССА, противоположную кодону UAG, чтобы ввести цитидин (C), неправильно спаривающийся с аденозином (A) (фиг. 10B), поскольку дезаминирование аденозина преимущественно происходит в сайтах ошибочно спаренных оснований А-С^{13,14}. Чтобы проверить оптимальную длину crPНК, нецелевые или нацеленные crPНК различной длины коэкспрессировали с белками dCas13a-ADAR1_{DD} в клетках HEK293T, стабильно экспрессирующих репортер-1. Явные эффекты редактирования PНК, на которые указывает появление экспрессии EGFP, наблюдались с crPНК, содержащими совпадающие последовательности длиной по меньшей мере 40 нуклеотидов, и чем длиннее crPНК, тем выше процент EGFP-положительных (фиг. 10C). Неожиданно оказалось, что экспрессия одной длинной crPНК^{Cas13a} достаточна для активации экспрессии EGFP, а совместная экспрессия dCas13a-ADAR1_{DD} скорее снижает активность crPНК (фиг. 10C, 10D). Экспрессия EGFP явно зависела от последовательности, поскольку 70-нуклеотидная (70-nt) (исключая 5'-каркас для расчета длины) контрольная PНК не могла активировать экспрессию EGFP (фиг. 10C, 10D).

[00253] Сделав неожиданное открытие о том, что определенные длинные сконструированные crPНК^{Cas13a} позволяют редактировать РНК независимо от dCas13a-ADAR1_{DD}, авторы изобретения решили удалить последовательность каркаса, рекрутирующую Cas13a, из crPНК. Поскольку crPНК₇₀ имела самую высокую активность по запуску экспрессии EGFP (фиг. 10C, 10D), авторы изобретения выбрали ту же направляющую РНК длиной 70 нт без каркаса, рекрутирующего Cas13a, для дальнейшего тестирования (фиг. 11A и последовательности arPНК в таблице 3 и контрольные РНК, примененные в примерах).

Таблица 3

Наименование	Последовательность (5' ---> 3')	Источник
Ctrl РНК ₇₀	Aaaccgaggggauc <u>auagggg</u> acugaa <u>u</u> cc <u>acc</u> auuc <u>u</u> uc <u>u</u> cc <u>cc</u> aa <u>u</u> cc <u>cc</u> ug <u>ca</u> ac <u>u</u> cc uuc <u>u</u> u <u>cc</u> ccugc (SEQ ID NO: 55)	ФИГ. 11
arРНК ₇₀	ugaacagcuccucgccc <u>u</u> ugcucacuggcagagccc <u>u</u> cCagcaucgcgagcaggcgcu gccuccuccgcc (SEQ ID NO: 56)	

Ctrl PHK ₇₁	Ucucaguccaauguaugguccgagcacaagcucuaaucaaaaguccgcggguguagac cgguugccauagga (SEQ ID NO: 57)	ФИГ.14 и ФИГ.16
arPHK ₇₁	acagcuccucgccccuugcucacuggcagagcccucCagcaucgcgagcaggcgugcc uccuccgcccug (SEQ ID NO: 58)	
arPHK ₇₁ - CAA	acagcuccucgccccuugcucacuggcagagcccucAagcaucgcgagcaggcgugcc uccuccgcccug (SEQ ID NO: 59)	ФИГ.16 А
arPHK ₇₁ - CUA	acagcuccucgccccuugcucacuggcagagcccucUagcaucgcgagcaggcgugcc uccuccgcccug (SEQ ID NO: 60)	
arPHK ₇₁ - CGA	acagcuccucgccccuugcucacuggcagagcccucGagcaucgcgagcaggcgugcc uccuccgcccug (SEQ ID NO: 61)	
arPHK ₇₁ - GCA	acagcuccucgccccuugcucacuggcagagcccucGCAgcaucgcgagcaggcgugcc uccuccgcccug (SEQ ID NO: 62)	ФИГ.16 В, с
arPHK ₇₁ - UCA	acagcuccucgccccuugcucacuggcagagcccucUCAgcaucgcgagcaggcgugcc uccuccgcccug (SEQ ID NO: 63)	
arPHK ₇₁ - ACA	acagcuccucgccccuugcucacuggcagagcccucACAagcaucgcgagcaggcgugcc uccuccgcccug (SEQ ID NO: 64)	
arPHK ₇₁ - CCU	acagcuccucgccccuugcucacuggcagagcccucCCUgcaucgcgagcaggcgugcc uccuccgcccug (SEQ ID NO: 65)	
arPHK ₇₁ - GCU	acagcuccucgccccuugcucacuggcagagcccucGCUgcaucgcgagcaggcgugcc uccuccgcccug (SEQ ID NO: 66)	
arPHK ₇₁ - UCU	acagcuccucgccccuugcucacuggcagagcccucUCUgcaucgcgagcaggcgugcc uccuccgcccug (SEQ ID NO: 67)	
arPHK ₇₁ -	acagcuccucgccccuugcucacuggcagagcccucACUgcaucgcgagcaggcgugcc	

ACU	cuccuccgccgcug (SEQ ID NO: 68)	
arPHK ₇₁ - CCC	acagcuccucgcccugcucacuggcagagccuCCGcaucgcgagcaggcgugc cuccuccgccgcug (SEQ ID NO: 69)	
arPHK ₇₁ - GCC	acagcuccucgcccugcucacuggcagagccuGCCgaucgcgagcaggcgugc cuccuccgccgcug (SEQ ID NO: 70)	
arPHK ₇₁ - UCC	acagcuccucgcccugcucacuggcagagccuUCCgaucgcgagcaggcgugc cuccuccgccgcug (SEQ ID NO: 71)	
arPHK ₇₁ - ACC	acagcuccucgcccugcucacuggcagagccuACCGcaucgcgagcaggcgugc cuccuccgccgcug (SEQ ID NO: 72)	
arPHK ₇₁ - CCG	acagcuccucgcccugcucacuggcagagccuCCGgaucgcgagcaggcgugc cuccuccgccgcug (SEQ ID NO: 73)	
arPHK ₇₁ - GCG	acagcuccucgcccugcucacuggcagagccuGCUgaucgcgagcaggcgugc cuccuccgccgcug (SEQ ID NO: 74)	
arPHK ₇₁ - UCG	acagcuccucgcccugcucacuggcagagccuUCGgaucgcgagcaggcgugc cuccuccgccgcug(SEQ ID NO: 75)	
arPHK ₇₁ - ACG	acagcuccucgcccugcucacuggcagagccuACGgaucgcgagcaggcgugc cuccuccgccgcug(SEQ ID NO: 76)	
arPHK ₃₁ - Репортер-1	acuggcagagcccucCagcaucgcgagcagg (SEQ ID NO: 77)	ФИГ. 16 и ФИГ. 27
arPHK ₅₁ - Репортер-1	gcccugcucacuggcagagcccucCagcaucgcgagcaggcgugccucc (SEQ ID NO: 78)	
arPHK ₉₁ - Репортер-1	acagcuccucgcccugcucacuggcagagcccucCagcaucgcgagcaggcgugcc uccuccgccgcug(SEQ ID NO: 79)	
arPHK ₁₁₁ - Репортер-1	acccgggugaacagcuccucgcccugcucacuggcagagcccucCagcaucgcgagc aggcgugccuccuccgccgcugccuccuccgc (SEQ ID NO: 80)	
arPHK ₁₃₁ -	gcucgaccaggauggggaccaccccgugaacagcuccucgcccugcucacuggcag	

Репортер-1	agcccucCagcaucgcgagcaggcgugccuccuccgcccugccuccuccgcccugc ccuccuccgcccugc (SEQ ID NO: 81)	
arPHK ₁₅₁ - Репортер-1	ucgcccugcagcucgaccaggaugggcaccaccccggaacagcuccucgcccucg ucacuggcagagcccucCagcaucgcgagcaggcgugccuccuccgcccugcucc uccgcccugcuccuccgcccugcagcuuguaca (SEQ ID NO: 82)	
arPHK ₁₇₁ - Репортер-1	gcccguuacgucgcccugcagcucgaccaggaugggcaccaccccggaacagcucc ucgcccucgucacuggcagagcccucCagcaucgcgagcaggcgugccuccuccgc cgugccuccuccgcccugcuccuccgcccugcagcuuguacagcucguccau (SEQ ID NO: 83)	
arPHK ₁₉₁ - Репортер-1	ugaacuuguggccguuacgucgcccugcagcucgaccaggaugggcaccaccccggu gaacagcuccucgcccucgucacuggcagagcccucCagcaucgcgagcaggcgug ccuccuccgcccugcuccuccgcccugcuccuccgcccugcagcuuguacagcu cguccaugccgcccug (SEQ ID NO: 84)	
arPHK ₂₁₁ - Репортер-1	ccggacacgcugaacuuguggccguuacgucgcccugcagcucgaccaggaugggca ccaccccggaacagcuccucgcccucgucacuggcagagcccucCagcaucgga gcaggcgugccuccuccgcccugcuccuccgcccugcuccuccgcccugcagc uuguacagcucguccaugccgcccggaggaguggcggc (SEQ ID NO: 85)	
arPHK ₃₁ - Репортер-2	gcgaccgggggaucucCacagauucuccggc (SEQ ID NO: 86)	
arPHK ₅₁ - Репортер-2	gcucacgguggcgaccgggggaucucCacagauucuccggcguguauaccu (SEQ ID NO: 87)	
arPHK ₇₁ - Репортер-2	ccucgcccucgucacgguggcgaccgggggaucucCacagauucuccggcguguau accuucugcugccu(SEQ ID NO: 88)	
arPHK ₉₁ - Репортер-2	gugaacagcuccucgcccucgucacgguggcgaccgggggaucucCacagauucuc cggcguguauaccuucgucgcccuccuccgccc (SEQ ID NO: 89)	
arPHK ₁₁₁ - Репортер-2	caccaccccggaacagcuccucgcccucgucacgguggcgaccgggggaucucCac agauucuccggcguguauaccuucgucgcccuccuccgcccugcuccucc (SEQ ID NO: 90)	
arPHK ₁₃₁ -	ccagggaugggcaccaccccggaacagcuccucgcccucgucacgguggcgaccgg	

Репортер-2	ggaucuCacagauucuuccggcguguauaccuucugcugccuccuccgcccugcc uccuccgcccugccu (SEQ ID NO: 91)	
arPHK ₁₅₁ - Репортер-2	uccagcucgaccaggaugggcaccaccccgugaacagcuccucgcccugcucacgg uggcgaccgggggaucuCacagauucuuccggcguguauaccuucugcugccucc cgcccugccuccuccgcccugccuccuccgccc (SEQ ID NO: 92)	
arPHK ₁₇₁ - Репортер-2	cggcgacguauccagcucgaccaggaugggcaccaccccgugaacagcuccucgccc uugcucacgguggcgaccgggggaucuCacagauucuuccggcguguauaccuucug cugccuccuccgcccugccuccuccgcccugccuccuccgcccugcagcuugua (SEQ ID NO: 93)	
arPHK ₁₉₁ - Репортер-2	uguggccguuuacgucgcccuccagcucgaccaggaugggcaccaccccgugaacag cuccucgcccugcucacgguggcgaccgggggaucuCacagauucuuccggcgugu auaccuucugcugccuccuccgcccugccuccuccgcccugccuccuccgcccugc agcuuguacagcugucc (SEQ ID NO: 94)	
arPHK ₂₁₁ - Репортер-2	acgcugaacuuguggccguuuacgucgcccuccagcucgaccaggaugggcaccaccc cgguagaacagcuccucgcccugcucacgguggcgaccgggggaucuCacagauucu uccggcguguauaccuucugcugccuccuccgcccugccuccuccgcccugccucc uccgcccugcagcuuguacagcucguccaugccgcccgg (SEQ ID NO: 95)	
arPHK ₇₁ (C+ 70)- Репортер-1	Cagcaucgcgagcaggcgugccuccuccgcccugccuccuccgcccugccuccuc cgcccugcagcuu (SEQ ID NO: 96)	ФИГ.16 Е
arPHK ₇₁ (5+ C+65)- Репортер-1	cccucCagcaucgcgagcaggcgugccuccuccgcccugccuccuccgcccugcc uccuccgcccugc (SEQ ID NO: 97)	
arPHK ₇₁ (10 +C+60)- Репортер-1	cagagcccucCagcaucgcgagcaggcgugccuccuccgcccugccuccuccgccc cugccuccuccgc (SEQ ID NO: 98)	
arPHK ₇₁ (15 +C+55)- Репортер 1	acuggcagagcccuccCagcaucgcgagcaggcgugccuccuccgcccugccuccu ccgcccugccucc (SEQ ID NO: 99)	
arPHK ₇₁ (20	ugcucacuggcagagcccucCagcaucgcgagcaggcgugccuccuccgcccugcc	

+C+50)- Репортер-1	uccuccgcccgcug (SEQ ID NO: 100)	
arPHK ₇₁ (25 +C+45)- Репортер-1	gcccucgucacuggcagagcccucCagcaucgagcaggcgcugccuccuccgcccgc cugccuccuccgc (SEQ ID NO: 101)	
arPHK ₇₁ (30 +C+40)- Репортер-1	uccucgcccucgucacuggcagagcccucCagcaucgagcaggcgcugccuccuc cgccgcugccucc (SEQ ID NO: 102)	
arPHK ₇₁ (40 +C+30)- Репортер-1	ggugaacagcuccucgcccucgucacuggcagagcccucCagcaucgagcaggcgc cugccuccuccgc (SEQ ID NO: 103)	
arPHK ₇₁ (45 +C+25)- Репортер-1	accccgguagaacagcuccucgcccucgucacuggcagagcccucCagcaucgagc aggcgcugccucc (SEQ ID NO: 104)	
arPHK ₇₁ (50 +C+20)- Репортер-1	gcaccaccccgguagaacagcuccucgcccucgucacuggcagagcccucCagcaucg cagcaggcgcug (SEQ ID NO: 105)	
arPHK ₇₁ (55 +C+15)- Репортер-1	gaugggcaccaccccgguagaacagcuccucgcccucgucacuggcagagcccucCag caucgagcagg (SEQ ID NO: 106)	
arPHK ₇₁ (60 +C+10)- Репортер-1	accaggauugggcaccaccccgguagaacagcuccucgcccucgucacuggcagagccc ucCagcaucgcga (SEQ ID NO: 107)	
arPHK ₇₁ (65 +C+5)- Репортер-1	gcucgaccaggauugggcaccaccccgguagaacagcuccucgcccucgucacuggcag agcccucCagcau (SEQ ID NO: 108)	
arPHK ₇₁ (70 +C)- Репортер-1	guccagcucgaccaggauugggcaccaccccgguagaacagcuccucgcccucgucacu ggcagagcccucC (SEQ ID NO: 109)	
arPHK ₇₁ (C+ 70)- Репортер-2	Cacagauucuccggcguguauaccuucugcugccuccuccgcccgcugccuccuccg ccgcugccuccucc (SEQ ID NO: 110)	
arPHK ₇₁ (5+ C+65)-	aucucCacagauucuccggcguguauaccuucugcugccuccuccgcccgcugccuc cuccgcccgcugccu	

Репортер-2	(SEQ ID NO: 111)	
arPHK ₇₁ (10 +C+60)-	cggggaucucCacagauucuuccggcguguauaccuucugcugccuccuccgccgcg gccuccuccgccgc	
Репортер-2	(SEQ ID NO: 112)	
arPHK ₇₁ (15 +C+55)-	gcgaccggggaucucCacagauucuuccggcguguauaccuucugcugccuccuccg ccgcugccuccucc	
Репортер-2	(SEQ ID NO: 113)	
arPHK ₇₁ (20 +C+50)-	cgguggcgaccggggaucucCacagauucuuccggcguguauaccuucugcugccuc cuccgccgcugccu	
Репортер-2	(SEQ ID NO: 114)	
arPHK ₇₁ (25 +C+45)-	gcucacgguggcgaccggggaucucCacagauucuuccggcguguauaccuucugcu gccuccuccgccgc	
Репортер-2	(SEQ ID NO: 115)	
arPHK ₇₁ (30 +C+40)-	cccuugcucacgguggcgaccggggaucucCacagauucuuccggcguguauaccuu cugcugccuccucc	
Репортер-2	(SEQ ID NO: 116)	
arPHK ₇₁ (40 +C+30)-	cagcuccucgcccucgucacgguggcgaccggggaucucCacagauucuuccggcg uguauaccuucugc	
Репортер-2	(SEQ ID NO: 117)	
arPHK ₇₁ (45 +C+25)-	gugaacagcuccucgcccucgucacgguggcgaccggggaucucCacagauucuuc cggcguguauaccu	
Репортер-2	(SEQ ID NO: 118)	
arPHK ₇₁ (50 +C+20)-	ccccggugaacagcuccucgcccucgucacgguggcgaccggggaucucCacagau ucuuccggcgugua	
Репортер-2	(SEQ ID NO: 119)	
arPHK ₇₁ (55 +C+15)-	caccacccggugaacagcuccucgcccucgucacgguggcgaccggggaucucCac agauucuuccggc	
Репортер-2	(SEQ ID NO: 120)	
arPHK ₇₁ (60 +C+10)-	augggcaccacccggugaacagcuccucgcccucgucacgguggcgaccggggauc ucCacagauucu	
Репортер-2	(SEQ ID NO: 121)	
arPHK ₇₁ (65 +C+5)-	ccaggaugggcaccacccggugaacagcuccucgcccucgucacgguggcgaccgg ggaucucCacaga	
Репортер-2	(SEQ ID NO: 122)	

arPHK ₇₁ (70 +C)- Репортер-2	cucgaccaggaugggcaccaccccgguagaacagcuccucgcccugcucacgguggcg accgggggaucucC (SEQ ID NO: 123)	
arPHK ₁₁₁ - CCA- Репортер-3 (UAG)	gaugggcaccaccccgguagaacagcuccucgcccugcucacuggcagagcccucCag caucgcgagcaggcgugccuccuccgcccugcagcuuguacagcucguccau (SEQ ID NO: 124)	ФИГ. 16 F, g
arPHK ₁₁₁ - GCA- Репортер-3 (UAC)	gaugggcaccaccccgguagaacagcuccucgcccugcucacuggcagagcccugCag caucgcgagcaggcgugccuccuccgcccugcagcuuguacagcucguccau (SEQ ID NO: 125)	
arPHK ₁₁₁ - UCA- Репортер-3 (UAA)	gaugggcaccaccccgguagaacagcuccucgcccugcucacuggcagagcccuaCag caucgcgagcaggcgugccuccuccgcccugcagcuuguacagcucguccau (SEQ ID NO: 126)	
arPHK ₁₁₁ - ACA- Репортер-3 (UAU)	gaugggcaccaccccgguagaacagcuccucgcccugcucacuggcagagcccuaCag caucgcgagcaggcgugccuccuccgcccugcagcuuguacagcucguccau (SEQ ID NO: 127)	
arPHK ₁₁₁ - CCG- Репортер-3 (CAG)	gaugggcaccaccccgguagaacagcuccucgcccugcucacuggcagagcccucCgg caucgcgagcaggcgugccuccuccgcccugcagcuuguacagcucguccau (SEQ ID NO: 128)	
arPHK ₁₁₁ - GCG- Репортер-3 (CAC)	gaugggcaccaccccgguagaacagcuccucgcccugcucacuggcagagcccugCgg caucgcgagcaggcgugccuccuccgcccugcagcuuguacagcucguccau (SEQ ID NO: 129)	
arPHK ₁₁₁ - UCG- Репортер-3 (CAA)	gaugggcaccaccccgguagaacagcuccucgcccugcucacuggcagagcccuaCgg caucgcgagcaggcgugccuccuccgcccugcagcuuguacagcucguccau (SEQ ID NO: 130)	
arPHK ₁₁₁ - ACG- Репортер-3	gaugggcaccaccccgguagaacagcuccucgcccugcucacuggcagagcccuaCgg caucgcgagcaggcgugccuccuccgcccugcagcuuguacagcucguccau (SEQ ID NO: 131)	

(CAU)		
arPHK ₁₁₁ - CCU- Репортер-3 (AAG)	gaugggcaccaccccgugaacagcuccucgcccugcucacuggcagagcccucCug caucgcgagcaggcgugccuccuccgcccugcagcuuguacagcucguccau (SEQ ID NO: 132)	
arPHK ₁₁₁ - GCU- Репортер-3 (AAC)	gaugggcaccaccccgugaacagcuccucgcccugcucacuggcagagcccugCug caucgcgagcaggcgugccuccuccgcccugcagcuuguacagcucguccau (SEQ ID NO: 133)	
arPHK ₁₁₁ - ACU- Репортер-3 (AAA)	gaugggcaccaccccgugaacagcuccucgcccugcucacuggcagagcccuaCug caucgcgagcaggcgugccuccuccgcccugcagcuuguacagcucguccau (SEQ ID NO: 134)	
arPHK ₁₁₁ - UCU- Репортер-3 (AAU)	gaugggcaccaccccgugaacagcuccucgcccugcucacuggcagagcccuuCug caucgcgagcaggcgugccuccuccgcccugcagcuuguacagcucguccau (SEQ ID NO: 135)	
arPHK ₁₁₁ - CCC- Репортер-3 (GAG)	gaugggcaccaccccgugaacagcuccucgcccugcucacuggcagagcccucCcg caucgcgagcaggcgugccuccuccgcccugcagcuuguacagcucguccau (SEQ ID NO: 136)	
arPHK ₁₁₁ - GCC- Репортер-3 (GAC)	gaugggcaccaccccgugaacagcuccucgcccugcucacuggcagagcccugCcg caucgcgagcaggcgugccuccuccgcccugcagcuuguacagcucguccau (SEQ ID NO: 137)	
arPHK ₁₁₁ - UCC- Репортер-3 (GAA)	gaugggcaccaccccgugaacagcuccucgcccugcucacuggcagagcccuuCcg caucgcgagcaggcgugccuccuccgcccugcagcuuguacagcucguccau (SEQ ID NO: 138)	
arPHK ₁₁₁ - ACC- Репортер-3 (GAU)	gaugggcaccaccccgugaacagcuccucgcccugcucacuggcagagcccuaCcg caucgcgagcaggcgugccuccuccgcccugcagcuuguacagcucguccau (SEQ ID NO: 139)	
Ctrl PHK ₁₁₁	Uaccgcuacagccacgcugauuucagcuauaccugcccgguaauaaagggacguucaca	ФИГ. 17

	ccgcgauguucucugcugggggaauugcgcgauauucaggauuaaaagaagugc (SEQ ID NO: 140)	
Ctrl PHK ₁₅₁	Acuacaguugcuccgauuuuaggcuacgucaauaggcacuaacuauuggcgucgg ugaacggacuuccucugaguaccagaagaugacuacaaaacuccuuuccauugcgag uauccggagucuggcucaguuuggccagggaggcacu (SEQ ID NO: 141)	
arPHK ₅₁ - PPIB	cggagaggguuggggccgcgguggcCaggagagccggcgccgccacgcgcgg (SEQ ID NO: 142)	
arPHK ₇₁ - PPIB	cagcugaggccggaagaggguuggggccgcgguggcCaggagagccggcgccgccacgc gcggguuggggggga (SEQ ID NO: 143)	
arPHK ₁₁₁ - PPIB	ggaggcgaaagcagcccgacagcugaggccggaagaggguuggggccgcgguggcCa gggagccggcgccgccacgcgcggguugggggggacuggggguugcucgcggggcuc (SEQ ID NO: 144)	
arPHK ₁₅₁ - PPIB	gaggcgagcauccacaggcgaggcgaaagcagcccgacagcugaggccggaagag gguggggccgcgguggcCaggagagccggcgccgccacgcgcggguugggggggacug ggguugcucgcgggcuccggggcgggcgggcgggcgccg (SEQ ID NO: 145)	
arPHK ₅₁ - KRAS	ucuugccuacgccaccagcuccaacCaccacaaguuuauauucagucuuu (SEQ ID NO: 146)	ФИГ.17 В
arPHK ₇₁ - KRAS	gucaaggcacucuugccuacgccaccagcuccaacCaccacaaguuuauauucaguca uuuucagcaggcc	
arPHK ₁₁₁ - KRAS	GauucugaauuagcuguaucgucaaggcacucuugccuacgccaccagcuccaacCa ccacaaguuuauauucagucuuuucagcaggccucucucccgaccuggggagc (SEQ ID NO: 147)	
arPHK ₁₅₁ - KRAS	aucauauucguccacaaaugauucugaauuagcuguaucgucaaggcacucuugccu acgccaccagcuccaacCaccacaaguuuauauucagucuuuucagcaggccucucu cccgaccuggggagccgcugagccucugggccccgc (SEQ ID NO: 148)	
arPHK ₅₁ - SMAD4	ucggcaugguaugaaguacuucgucCaggagcuggagggcccgguuaagu (SEQ ID NO: 149)	
arPHK ₇₁ - SMAD4	gggucugcaauccggaugguaugaaguacuucgucCaggagcuggagggcccggu uaagugaauucaa (SEQ ID NO: 150)	

arPHK ₁₁₁ - SMAD4	gaccucagucuaaagguugugggucugcaaucggcaugguaugaaguacuucgucCa ggagcuggagggcccgguuaagugaauucaauccagcaagguguuucuuga (SEQ ID NO: 151)	
arPHK ₁₅₁ - SMAD4	uaagggccccaacgguaaaagaccucagucuaaagguugugggucugcaaucggcaug guaugaaguacuucgucCaggagcuggagggcccgguuaagugaauucaauccag caagguguuucuugaugcucugucuuggguaaucc (SEQ ID NO: 152)	
arPHK ₅₁ - FANCC (ТАС сайт)	ugggggguucggcugccgacaucagCaauugcucugccaccaucucagccc (SEQ ID NO: 153)	
arPHK ₇₁ - FANCC (ТАС сайт)	agcagggccgugggggguucggcugccgacaucagCaauugcucugccaccaucuca gccauccuccgaa (SEQ ID NO: 154)	
arPHK ₁₁₁ - FANCC (ТАС сайт)	aguagaaggccaagagccacagcagggccgugggggguucggcugccgacaucagCa auugcucugccaccaucucagcccauccuccgaagugaauaacaggaaccagc (SEQ ID NO: 155)	
arPHK ₁₅₁ - FANCC (ТАС сайт)	ccuccaucacgggggcccguaguagaaggccaagagccacagcagggccguggggggu ucggcugccgacaucagCaauugcucugccaccaucucagcccauccuccgaagugaa ugaacaggaaccagcucuaaagggaccuccgcag (SEQ ID NO: 156)	
arPHK ₁₅₁ - PPIB (AAG сайт)	gccaacaccacatgcttgccatctagccaggctgtcttgactgtcgtgatgaagaactgggag ccgttggtgtcCttgcctgcgttgccatgctcaccagccaggcccgtagtgttcagtttgaa gttctcatcggggaagcgctca (SEQ ID NO: 157)	ФИГ.17 С
arPHK ₁₅₁ - PPIB (CAG сайт)	gggagtgggtccgctccaccagatgccagcaccggggccagtgcagctcagagccctgtgg cggactacagggccCgcacagacgggtcactcaaagaaagatgtccctgtgccctactccttgg cgatggcaaagggttctccacctcga (SEQ ID NO: 158)	
arPHK ₁₅₁ - FANCC (AAG сайт)	tgcattttgtaaaatagatactagcagattgtccaagatgtgtacagctcattctcacagcccagc gagggcacCtactccacaaatgcgtggccacaggtcatcacctgtcctgtggccctggcgagc ctgatccctcacgccgggcac (SEQ ID NO: 159)	
arPHK ₁₅₁ - FANCC	gctcattctcacagcccagcgagggcacttactccacaaatgcgtggccacaggtcatcacctg tcctgtggcccCggcgagcctgatccctcacgccgggcacccacacggcctgcgtgccttcta	

(CAG сайт)	gacttgagttcgcagctctttaag (SEQ ID NO: 160)	
arPHK ₁₅₁ - IDUA (CAG сайт)	tcggccggggccctgggggcggtgggcgctggccaggacgcccaccgtgtggttgcgtccag gacggtcccggccCgcgacacttcggcccagagctgctcctcatccagcagcggccagcagc cccatggccgtgagcaccggcttgcgca (SEQ ID NO: 161)	
arPHK ₁₁₁ - TARDBP	ugaccagucuuagaucuuucugaccugcaccauaagaacuucuccaaagguacCaa aaauacucuuucagguccguucgguuguuuuccaugggagaccaaacuauu (SEQ ID NO: 162)	ФИГ. 17 D
arPHK ₁₁₁ - CGA- Репортер-3 (UAG)	gaugggcaccaccccgguagaacagcuccucgcccugcucacuggcagagcccucGag caucgcgagcaggcgugccuccuccgcccugcagcuuguacagcucguccau (SEQ ID NO: 163)	ФИГ. 17 G
arPHK ₁₁₁ - GGA- Репортер-3 (UAC)	gaugggcaccaccccgguagaacagcuccucgcccugcucacuggcagagcccugGag caucgcgagcaggcgugccuccuccgcccugcagcuuguacagcucguccau (SEQ ID NO: 164)	
arPHK ₁₁₁ - UGA- Репортер-3 (UAA)	gaugggcaccaccccgguagaacagcuccucgcccugcucacuggcagagcccuaGag caucgcgagcaggcgugccuccuccgcccugcagcuuguacagcucguccau (SEQ ID NO: 165)	
arPHK ₁₁₁ - AGA- Репортер-3 (UAU)	gaugggcaccaccccgguagaacagcuccucgcccugcucacuggcagagcccuaGag caucgcgagcaggcgugccuccuccgcccugcagcuuguacagcucguccau (SEQ ID NO: 166)	
arPHK ₁₁₁ - CGG- Репортер-3 (CAG)	gaugggcaccaccccgguagaacagcuccucgcccugcucacuggcagagcccucGgg caucgcgagcaggcgugccuccuccgcccugcagcuuguacagcucguccau (SEQ ID NO: 167)	
arPHK ₁₁₁ - GGG- Репортер-3 (CAC)	gaugggcaccaccccgguagaacagcuccucgcccugcucacuggcagagcccugGg gcaucgcgagcaggcgugccuccuccgcccugcagcuuguacagcucguccau (SEQ ID NO: 168)	
arPHK ₁₁₁ -	gaugggcaccaccccgguagaacagcuccucgcccugcucacuggcagagcccuaGg	

UGG- Репортер-3 (CAA)	gcaucgcgagcaggcgugccuccuccgccugcagcuuguacagcucguccau (SEQ ID NO: 169)
arPHK ₁₁₁ - AGG- Репортер-3 (CAU)	gaugggcaccaccccgugaacagcuccucgcccugcucacuggcagagcccuaGgg caucgcgagcaggcgugccuccuccgccugcagcuuguacagcucguccau (SEQ ID NO: 170)
arPHK ₁₁₁ - CGU- Репортер-3 (AAG)	gaugggcaccaccccgugaacagcuccucgcccugcucacuggcagagcccucGug caucgcgagcaggcgugccuccuccgccugcagcuuguacagcucguccau (SEQ ID NO: 171)
arPHK ₁₁₁ - GGU- Репортер-3 (AAC)	gaugggcaccaccccgugaacagcuccucgcccugcucacuggcagagcccugGu gcaucgcgagcaggcgugccuccuccgccugcagcuuguacagcucguccau (SEQ ID NO: 172)
arPHK ₁₁₁ - AGU- Репортер-3 (AAA)	gaugggcaccaccccgugaacagcuccucgcccugcucacuggcagagcccuaGug caucgcgagcaggcgugccuccuccgccugcagcuuguacagcucguccau (SEQ ID NO: 173)
arPHK ₁₁₁ - UGU- Репортер-3 (AAU)	gaugggcaccaccccgugaacagcuccucgcccugcucacuggcagagcccuaGu gcaucgcgagcaggcgugccuccuccgccugcagcuuguacagcucguccau (SEQ ID NO: 174)
arPHK ₁₁₁ - CGC- Репортер-3 (GAG)	gaugggcaccaccccgugaacagcuccucgcccugcucacuggcagagcccucGcg caucgcgagcaggcgugccuccuccgccugcagcuuguacagcucguccau (SEQ ID NO: 175)
arPHK ₁₁₁ - GGC- Репортер-3 (GAC)	gaugggcaccaccccgugaacagcuccucgcccugcucacuggcagagcccugGcg caucgcgagcaggcgugccuccuccgccugcagcuuguacagcucguccau (SEQ ID NO: 176)
arPHK ₁₁₁ - UGC- Репортер-3	gaugggcaccaccccgugaacagcuccucgcccugcucacuggcagagcccuaGcg caucgcgagcaggcgugccuccuccgccugcagcuuguacagcucguccau (SEQ ID NO: 177)

(GAA)		
arPHK ₁₁₁ - AGC- Репортер-3 (GAU)	gaugggcaccaccccggugaacagcuccucgcccugcucacuggcagagcccuaGcg caucgcgagcaggcgugccuccuccgcccugcagcuuguacagcucguccau (SEQ ID NO: 178)	
arPHK ₁₁₁ - CGA- Репортер-3 (UAG)	gaugggcaccaccccggugaacagcuccucgcccugcucacuggcagagcccucGag caucgcgagcaggcgugccuccuccgcccugcagcuuguacagcucguccau (SEQ ID NO: 179)	
arPHK ₁₁₁ - GGA- Репортер-3 (UAG)	gaugggcaccaccccggugaacagcuccucgcccugcucacuggcagagcccucGga gcaucgcgagcaggcgugccuccuccgcccugcagcuuguacagcucguccau (SEQ ID NO: 180)	
arPHK ₁₁₁ - UGA- Репортер-3 (UAG)	gaugggcaccaccccggugaacagcuccucgcccugcucacuggcagagcccucUGa gcaucgcgagcaggcgugccuccuccgcccugcagcuuguacagcucguccau (SEQ ID NO: 181)	
arPHK ₁₁₁ - AGA- Репортер-3 (UAG)	gaugggcaccaccccggugaacagcuccucgcccugcucacuggcagagcccucAGa gcaucgcgagcaggcgugccuccuccgcccugcagcuuguacagcucguccau (SEQ ID NO: 182)	ФИГ.17 Н
arPHK ₁₁₁ - CGU- Репортер-3 (UAG)	gaugggcaccaccccggugaacagcuccucgcccugcucacuggcagagcccucGU gcaucgcgagcaggcgugccuccuccgcccugcagcuuguacagcucguccau (SEQ ID NO: 183)	
arPHK ₁₁₁ - CGG- Репортер-3 (UAG)	gaugggcaccaccccggugaacagcuccucgcccugcucacuggcagagcccucGG gcaucgcgagcaggcgugccuccuccgcccugcagcuuguacagcucguccau (SEQ ID NO: 184)	
arPHK ₁₁₁ - CGC- Репортер-3 (UAG)	gaugggcaccaccccggugaacagcuccucgcccugcucacuggcagagcccucGC gcaucgcgagcaggcgugccuccuccgcccugcagcuuguacagcucguccau (SEQ ID NO: 185)	
arPHK ₁₁₁ -	gaugggcaccaccccggugaacagcuccucgcccugcucacuggcagagcccucGug	

CGU- Репортер-3 (AAG)	caucgcgagcaggcgugccuccuccgcccugcagcuuguacagcucguccau (SEQ ID NO: 186)	
arPHK ₁₁₁ - GGU- Репортер-3 (AAG)	gaugggcaccaccccgugaacagcuccucgcccugcucacuggcagagcccuGGu gcaucgcgagcaggcgugccuccuccgcccugcagcuuguacagcucguccau (SEQ ID NO: 187)	
arPHK ₁₁₁ - UGU- Репортер-3 (AAG)	gaugggcaccaccccgugaacagcuccucgcccugcucacuggcagagcccuUGu gcaucgcgagcaggcgugccuccuccgcccugcagcuuguacagcucguccau (SEQ ID NO: 188)	
arPHK ₁₁₁ - AGU- Репортер-3 (AAG)	gaugggcaccaccccgugaacagcuccucgcccugcucacuggcagagcccuAGu gcaucgcgagcaggcgugccuccuccgcccugcagcuuguacagcucguccau (SEQ ID NO: 189)	
arPHK ₁₁₁ - CGA- Репортер-3 (AAG)	gaugggcaccaccccgugaacagcuccucgcccugcucacuggcagagcccuCGA gcaucgcgagcaggcgugccuccuccgcccugcagcuuguacagcucguccau (SEQ ID NO: 190)	
arPHK ₁₁₁ - CGC- Репортер-3 (AAG)	gaugggcaccaccccgugaacagcuccucgcccugcucacuggcagagcccuCGC gcaucgcgagcaggcgugccuccuccgcccugcagcuuguacagcucguccau (SEQ ID NO: 191)	
arPHK ₁₁₁ - CGG- Репортер-3 (AAG)	gaugggcaccaccccgugaacagcuccucgcccugcucacuggcagagcccuCGG gcaucgcgagcaggcgugccuccuccgcccugcagcuuguacagcucguccau (SEQ ID NO: 192)	
arPHK ₁₁₁ - KRAS-AG6	gauucugaauuagcuguaucgucaaggcacucgugccgacgccaccagcuccaacCac cacaaguggagagucagucuuuuucagcaggccucucucccgaccuggggagc (SEQ ID NO: 193)	ФИГ.17I
arPHK ₁₁₁ - KRAS-AG9	gauucugaauuagcuggaucgucaaggcacucgggcccagccaccagcuccaacCac cacaaguggagagucagucuuuuucagcaggccucucucccgaccggggagc (SEQ ID NO: 194)	
arPHK ₁₁₁ -	gggagcagccucuggcauucugggagcuucaucuggaccugggucuucagugaacCa	ФИГ.23

TP53	uuguucaauaucguccggggacagcaucaaaucauccauugcuugggacggcaa (SEQ ID NO: 195)	
arPHK ₁₁₁ - TP53-AG1	gggagcagccucuggcgauucugggagcuucaucuggaccugggucuucagugaacCa uuguucaagaucguccggggacagcaucaaaucauccauugcuugggacggcaa (SEQ ID NO: 196)	
arPHK ₁₁₁ - TP53-AG4	gggagcagccucuggcagucggggagcuucaucuggaccugggucuucagugaacCa uuguucaagaucguccggggacagcaucaaaucauccagugcuugggacggcaa (SEQ ID NO: 197)	
arPHK ₁₁₁ - COL3A1	cauauuacagaauaccuugauagcauccaauuugcauccuuggguagggucaaccCa guauuccacucucugaguucaggauggcagaauuucaggucucugcaguuuu (SEQ ID NO: 198)	ФИГ.26
arPHK ₁₁₁ - BMP2	gugaagauaagccaguccucuaguaacagaugagcaagacggcaagagcuuaccCa ucacuuguguggagacuuaauacuugcauaaagauccauugggagauaguacuc (SEQ ID NO: 199)	
arPHK ₁₁₁ - AHI1	gugaacgucaaacugucggaccaauauggcagaauucucucaucucaacuucCau auccguaucauggaaucauagcauccguuaacuacuagcucucuacagcugg (SEQ ID NO: 200)	
arPHK ₁₁₁ - FANCC (Сайт 2)	gccaaugaucucugagauuauucagcagugugagccaucaggguagacaaccCa ggcgauugugugccuccaggagcccagagcaggaaguugaggagaaggugccu (SEQ ID NO: 201)	
arPHK ₁₁₁ - MYBPC3	caagacggugaaccacuccauggucuucuuugucggcuuucugcacuguguaccccCa gagcuccguguugccgacauccugggguggcuuccacuccagagccacauaag (SEQ ID NO: 202)	
arPHK ₁₁₁ - IL2RG	aggauucucuuuugaaguauugcucuccccaguggauuggguggcuccauucacucCa augcugagcacuuccacagaguggguuaaagcggcuccgaacacgaaacgugua (SEQ ID NO: 203)	
arPHK ₁₁₁ - IDUA-V1	gacgccaccgugugguugcuguccaggacggucccgccugcgacacuucggccCa gagcugcuccucauccagcagcgccagcagccccauggccgugagcaccggcuu (SEQ ID NO: 204)	ФИГ.29
arPHK ₁₁₁ - IDUA-V2	gacgccaccgugugguugcuguccaggacggucccgccugcgacacuucggccCa gagcugcuccucaucugcgggggcgggggggggccgucgcccguggggucguug (SEQ ID NO: 205)	

[00254] Оказалось, что данная линейная направляющая РНК индуцировала сильную экспрессию EGFP почти в 40 % всех клеток, несущих Репортер-1 (фиг. 11В, сверху).

Поскольку эндогенные белки ADAR могут редактировать субстраты двухцепочечной РНК (дцРНК)¹², авторами изобретения был сделан вывод, что длинные направляющие РНК могут отжигаться с транскриптами-мишенями с образованием субстратов дцРНК, которые, в свою очередь, привлекают эндогенные белки ADAR для целевого редактирования. Таким образом, такая направляющая РНК обозначена как агРНК (ADAR-рекрутирующая РНК).

[00255] Чтобы проверить, действительно ли эндогенные белки ADAR ответственны за вышеуказанное наблюдение, было решено изучить опосредованное агРНК редактирование РНК в ADAR-дефицитных клетках. Поскольку мРНК ADAR2 практически не обнаруживалась в клетках HEK293T (фиг. 12A), авторы изобретения создали клетки HEK293T ADAR1^{-/-}, т.е. данная клеточная линия дефицитна как по ADAR1, так и по ADAR2 (фиг. 11C, d). Действительно, истощение ADAR1 аннулировало индуцированные агРНК₇₀ сигналы EGFP (фиг. 11B, нижняя). Более того, экзогенная экспрессия ADAR1^{p110}, ADAR1^{p150} или ADAR2 в клетках HEK293T ADAR1^{-/-} (фиг. 11C, d) успешно компенсировала потерю индукции EGFP с помощью агРНК₇₀ (фиг. 11E, фиг. 12B), демонстрируя, что агРНК-индуцированная экспрессия репортера EGFP зависела исключительно от нативного ADAR1, активность которого могла быть восстановлена либо его изоформами (p110 и p150), либо ADAR2. Анализ секвенирования по Сэнгеру на целевой области агРНК₇₀ показал пик перекрытия A/G в предсказанном сайте аденозина в UAG, что указывает на значительную конверсию A в I (G) (фиг. 11F). Секвенирование следующего поколения (NGS) дополнительно подтвердило, что степень превращения A в I составляла примерно 13 % от общего числа репортерных транскриптов (Фиг. 11G). Количественный анализ ПЦР показал, что агРНК₇₀ не снижает экспрессию целевых транскриптов (фиг. 13), исключая возможный эффект РНКи агРНК. В совокупности данные, полученные в настоящем исследовании, продемонстрировали, что агРНК способна генерировать значительный уровень редактирования целевых транскриптов через сконструированную ошибку спаривания A-C.

Пример 7. LEAPER позволяет редактировать РНК в нескольких клеточных линиях.

[00256] Поскольку экспрессия эндогенных белков ADAR является предпосылкой для опосредованного LEAPER редактирования РНК, эффективность LEAPER протестировали на панели клеточных линий, происходящих от разных тканей, включая HT29, A549, HepG2, RD, SF268, SW13 и HeLa. Сначала исследовали эндогенную экспрессию всех трех видов белков ADAR с помощью вестерн-блоттинга. ADAR1 высоко экспрессировался во всех тестируемых клеточных линиях, и его идентичность в Вестерн-блоттинге была подтверждена отрицательным контролем, линией HEK293T ADAR1^{-/-} (фиг. 14A, b). ADAR3 был обнаружен только в клетках HepG2 и HeLa (фиг. 14A, b). ADAR2 не

обнаруживался ни в каких клетках, результат не был связан с неудачей вестерн-блоттинга, поскольку белок ADAR2 можно было обнаружить в клетках HEK293T, сверхэкспрессирующих ADAR2 (фиг. 14A, b). Эти находки согласуются с предыдущими сообщениями о том, что ADAR1 экспрессируется повсеместно, тогда как экспрессия ADAR2 и ADAR3 ограничена определенными тканями¹¹.

[00257] Затем приступили к тестированию эффективности редактирования переконструированной 71-нуклеотидной агРНК (агРНК₇₁), нацеленной на Репортер-1 (фиг. 15A и последовательности агРНК и контрольных РНК, применяемые в настоящем исследовании, как указано выше) в указанных клеточных линиях.

[00258] LEAPER работал во всех протестированных клетках для данной агРНК₇₁, хотя и с различной эффективностью (фиг. 14C). Результаты согласуются с предыдущим отчетом о том, что уровни белка ADAR1/2 коррелируют с выходом редактирования РНК⁴², за исключением клеток HepG2 и HeLa. Субоптимальные корреляции эффективности редактирования с уровнями ADAR1, вероятно, были связаны с обильными уровнями экспрессии ADAR3 в этих двух линиях (фиг. 14A, b), поскольку сообщалось, что ADAR3 играет ингибирующую роль в редактировании РНК. Важно отметить, что LEAPER также работал с тремя разными клеточными линиями мышиногo происхождения (NIH3T3, мышинный эмбриональный фибробласт (MEF) и B16) (фиг. 14D), открывая путь для тестирования его терапевтического потенциала на животных и моделях болезней. В совокупности авторы изобретения пришли к выводу, что LEAPER представляет собой универсальный инструмент для широкого спектра типов клеток и для разных организмов.

Пример 8. Характеристика и оптимизация LEAPER.

[00259] Чтобы лучше охарактеризовать и оптимизировать LEAPER, был исследован выбор нуклеотида, противоположного аденозину, в триplete UAG транскрипта-мишени. В клетках HEK293T агРНК₇₁, нацеленная на Репортер-1, показала переменную эффективность редактирования с измененным триплетом (5'-CNA, N означает один из A/U/C/G), противоположным целевому UAG (последовательности агРНК и контрольные РНК по настоящему изобретению, как указано выше). Ошибка спаривания А-С привела к наивысшей эффективности редактирования, а ошибка спаривания А-Г привела к меньшим, но очевидным изменениям (фиг. 16A). Затем исследовали предпочтение нуклеотидов, фланкирующих ошибку спаривания А-С в агРНК. Протестировали все 16 комбинаций 5' и 3' соседних сайтов, окружающих цитидин (5'-N¹CN²) (последовательности агРНК и контрольных РНК по настоящему изобретению, как указано выше), и обнаружили, что 3' соседний аденозин необходим для эффективного редактирования, в то время как аденозин является наименее предпочтительным нуклеотидом в 5'-сайте (фиг. 16B, C). Таким образом,

авторы изобретения пришли к выводу, что мотив ССА на агРНК обеспечивает наивысшую эффективность редактирования, направленного на сайт UAG. Стоит отметить, что 3' соседний гуанозин (5'-N¹CG) в агРНК проявлял сильный ингибирующий эффект (фиг. 16B, C).

[00260] Длина РНК оказалась релевантной для эффективности агРНК в управлении редактированием целевых транскриптов (фиг. 10C), что согласуется с предыдущим отчетом⁴². Чтобы полностью понять этот эффект, протестировали агРНК с вариабельной длиной, нацеленные на два разных репортерных транскрипта - Репортер-1 и Репортер-2 (Фиг. 15A, b). Для любого репортерного нацеливания были разработаны и протестированы агРНК 10 различных размеров, от 31 до 211 нуклеотидов, с триплетом ССА (для нацеливания на UAG) прямо посередине (последовательности агРНК и контрольных РНК по настоящему изобретению, как указано выше). Основываясь на активности репортера EGFP, длина агРНК положительно коррелировала с эффективностью редактирования для обоих репортеров, достигая пика от 111 до 191 нуклеотида (фигура 16D). Хотя одна агРНК₅₁ казалась работающей, длина в 71 нуклеотид (71-nt) была минимальной для агРНК, чтобы работать для обоих репортеров (фиг. 16D).

[00261] Затем исследовали влияние положения ошибки спаривания А-С в агРНК на эффективность редактирования. Зафиксировали длину всех агРНК для тестирования на значении 71 нуклеотид и сдвинули триплет АСС, нацеленный на UAG, с 5' на 3' внутри агРНК (последовательности агРНК и контрольных РНК по настоящему изобретению, как указано выше). Оказалось, что размещение ошибки спаривания А-С в середине области привела к высокому результату редактирования, а агРНК с сайтами ошибки спаривания, близкими к 3'-концу, превзошли по эффективности таковые, близкие к 5'-концу, в обоих репортерах (фиг. 16E). Для удобства поместили ошибку спаривания А-С в центр агРНК для всех последующих исследований.

[00262] Авторы изобретения также протестировали гибкость нацеливания LEAPER и попытались определить, является ли UAG на мишени единственным мотивом, подвергающимся редактированию РНК. Для всех 16 комбинаций триплетов (5'-N¹AN²) на Репортере-3 (фиг. 15C) применяли соответствующие агРНК фиксированной длины (111 нуклеотидов – 111-nt) и обеспечили идеальное совпадение секвенирования для агРНК и репортера, за исключением редактирования сайта (ошибка спаривания А-С) (фиг. 16F и последовательности агРНК и контрольных РНК по настоящему изобретению, как указано выше). Результаты NGS показали, что все мотивы N¹AN² редактируются. UAN² и GAN² являются наиболее и наименее предпочтительными мотивами соответственно (фиг. 16F, g). В совокупности предпочтение ближайшего соседа целевого аденозина представляет собой

5' U>C≈A>G и 3' G>C>A≈U (фиг. 16G).

Пример 9. Редактирование эндогенных транскриптов с помощью LEAPER.

[00263] Затем авторы изобретения исследовали, может ли LEAPER обеспечить эффективное редактирование эндогенных транскриптов. Применяя агРНК разной длины, авторы изобретения нацелили мотивы UAG в транскриптах генов PPIB, KRAS и SMAD4 и мотив UAC в транскрипте гена FANCC (фиг. 17A, последовательности агРНК и контрольные РНК по настоящему изобретению, как указано выше). Обнадеживает то, что целевые аденозиновые сайты во всех четырех транскриптах редактировались соответствующими агРНК всех четырех размеров, хотя и с различной эффективностью в соответствии с результатами NGS (фиг. 17B). В соответствии с предыдущим наблюдением, более длинные агРНК имеют тенденцию давать более высокие скорости редактирования. Следует отметить, что 151-нуклеотидный (151-nt) агРНК^{PPIB} редактировал примерно 50 % всех транскриптов гена PPIB (фиг. 17B). Ни одна из агРНК не проявляла влияния РНКи на их целевые транскрипты (фиг.18A) или конечный уровень белка (например, KRAS, фиг.18B). Кроме того, LEAPER может достичь желаемой скорости редактирования на сайтах, не относящихся к UAN (фиг. 17C и последовательности агРНК и контрольных РНК по настоящему изобретению, как указано выше), что демонстрирует гибкость LEAPER при редактировании эндогенных транскриптов. Чтобы дополнительно изучить возможности LEAPER, проверили, может ли он одновременно нацеливать несколько сайтов. Наблюдали мультиплексное редактирование транскриптов TARDBP и FANCC путем совместной экспрессии двух агРНК (последовательности агРНК и контрольных РНК по настоящему изобретению, как указано выше), с эффективностью даже выше, чем с отдельными агРНК (фиг.17D), что указывает на то, что LEAPER хорошо подходит для одновременного редактирования нескольких целей.

[00264] Примечательно, что ADAR1/2 имеет тенденцию беспорядочно дезаминировать несколько аденозинов в дуплексе РНК⁴⁴, и ошибка спаривания А-С не является единственным мотивом, который направляет переключение А в I (фиг. 16A). Поэтому разумно предположить, что все аденозины в транскриптах-мишенях в пределах покрытия агРНК подвергаются различным уровням редактирования, основным источникам нежелательных модификаций. Чем длиннее агРНК, тем выше вероятность таких отклонений от цели. Поэтому авторы изобретения исследовали все сайты аденозина в областях покрытия агРНК в этих транскриптах-мишенях. Для транскриптов PPIB наблюдалось очень небольшое нецелевое редактирование на протяжении всего окна секвенирования для различных размеров агРНК (фиг. 17E, F). Однако в случаях нацеливания на гены KRAS, SMAD4 и FANCC были обнаружены множественные

нецелевые изменения (фиг. 19A-F). В частности, для KRAS 11 из 30 аденозинов претерпели существенные преобразования А в І в окне секвенирования агРНК₁₁₁ (фиг. 19A, b).

[00265] Затем авторы изобретения попытались разработать стратегии для минимизации таких нежелательных нецелевых эффектов. Поскольку ошибка спаривания А-Г подавляет редактирование для нацеливания UAG (фиг. 16A), авторы изобретения предположили, что сочетание гуанозина с не нацеливающим аденозином может уменьшить нежелательное редактирование. Затем авторы изобретения проверили влияние ошибки спаривания А-Г на аденозин во всех возможных комбинациях триплетов (5'-N¹AN²), как в репортере-3 (фиг. 15C и последовательности агРНК и контрольных РНК по настоящему изобретению, как указано выше). Ошибка спаривания А-Г действительно уменьшала редактирование аденозина во всех тестируемых мишенях, за исключением нацеливания UAG или AAG (примерно 2 %) (фиг. 17G), по сравнению с ошибкой спаривания А-С (фиг. 16F). Чтобы еще больше снизить скорость редактирования на нежелательных сайтах, продолжили тестирование эффекта двух последовательных ошибок спаривания. Оказалось, что дополнительная ошибка спаривания на 3'-конце нуклеотида триплета, противоположного UAG или AAG, отменяет соответствующее редактирование аденозина (фиг. 17H и последовательности агРНК и контрольных РНК по настоящему изобретению, как указано выше). В свете этих результатов авторы изобретения попытались применить данное правило для уменьшения количества нецелевых в транскриптах KRAS (фиг. 19A). Сначала разработали агРНК (агРНК₁₁₁-AG6), которая создавала ошибку спаривания А-Г по всем "склонным к редактированию" мотивам, покрытым агРНК₁₁₁ (фиг. 17I, фиг. 19A и последовательности агРНК и контрольных РНК по настоящему изобретению, как указано выше), включая AAU (61-й), UAU (63-й), UAA (65-й), AAA (66-й), UAG (94-й) и AAG (99-й). Указанный агРНК₁₁₁-AG6 устранил большую часть нецелевого редактирования, сохраняя при этом целевую скорость редактирования примерно 5 %. В соответствии с результатами на фиг. 17G, одиночная ошибка спаривания А-Г не могла полностью минимизировать редактирование в мотиве AAG (99-й) (фиг. 17I и фиг. 19A). Затем добавили больше ошибок спаривания на агРНК₁₁₁-AG6, включая двойную ошибку спаривания (5'-CGG, противоположный целевому мотиву 5'-AAG), плюс три дополнительных ошибки спаривания А-Г для смягчения редактирования на 27-м, 98-м и 115-м аденозинах (агРНК₁₁₁-AG9) (Последовательности агРНК и контрольных РНК по настоящему изобретению, как указано выше). Следовательно, была достигнута значительно улучшенная специфичность редактирования без дополнительной потери скорости редактирования на целевом сайте (A76) (фиг. 17I). Таким образом, созданный LEAPER, включающий дополнительные правила, обеспечивает эффективное и более точное

редактирование РНК в эндогенных транскриптах.

Пример 10. Специфичность редактирования РНК LEAPER.

[00266] Помимо возможных нецелевых эффектов в области дцРНК, покрытой агРНК, беспокойство также вызывали потенциальные нецелевые эффекты на другие транскрипты за счет частичного спаривания оснований агРНК. Авторы изобретения затем выполнили анализ секвенирования РНК всего транскриптома, чтобы оценить глобальные нецелевые эффекты LEAPER. Клетки трансфицировали плазмидами, экспрессирующими Ctrl РНК₁₅₁ или РРІВ-специфичную агРНК (агРНК₁₅₁-РРІВ), перед тем, как подвергать их анализу секвенирования РНК. Определили шесть потенциальных нецелевых в группе Ctrl РНК₁₅₁ (фиг. 20А) и пять в группе агРНК₁₅₁-РРІВ (фиг. 20В), и частота попадания в цель РРІВ на основе анализа NGS составила примерно 37 % (фиг. 20В). Дальнейший анализ показал, что все сайты, за исключением двух сайтов из транскриптов EIF2AK2, были расположены либо в областях SINE (Alu), либо в LINE (фиг. 20А, b), оба склонны к ADAR-опосредованному редактированию⁴⁵, что позволяет предположить, что эти нецелевые не могут быть получены в результате спаривания между транскриптами-мишенями и агРНК или контрольной РНК. Следует отметить, что два ненацеленных транскрипта, WDR73 и SMYD4, появились в обеих группах, что предполагает, что они вряд ли представляют собой зависимое от последовательности редактирование РНК. Действительно, анализ минимальной свободной энергии показал, что все эти возможные нецелевые транскрипты не смогли образовать стабильный дуплекс ни с Ctrl РНК₁₅₁, ни с агРНК₁₅₁-РРІВ (фиг. 20С). Чтобы дополнительно проверить, генерирует ли агРНК зависящие от последовательности нецелевые участки, авторы изобретения выбрали потенциальные нецелевые сайты, сравнивая сходство последовательностей с применением NCBI BLAST как для агРНК₁₅₁-РРІВ, так и для агРНК₁₁₁-FANCC. Транскрипты TRAPPC12 для агРНК₁₅₁-РРІВ и три сайта в транскриптах ST3GAL1, OSTM1-AS1 и EHD2 для агРНК₁₁₁-FANCC были лучшими кандидатами (фиг. 20D и фиг. 21А). Анализ NGS показал, что никакое редактирование не могло быть обнаружено ни в одном из указанных предсказанных нецелевых сайтов (фиг. 20D и фиг. 21В). Эти результаты показывают, что LEAPER дает возможность эффективного редактирования на целевом сайте, сохраняя при этом специфичность всего транскриптома без детектируемых зависимых от последовательности нецелевых изменений.

Пример 11. Оценка безопасности LEAPER в клетках млекопитающих.

[00267] Поскольку агРНК полагаются на эндогенные белки ADAR для редактирования транскриптов-мишеней, необходимо было выяснить, влияет ли добавление экзогенных агРНК на события редактирования нативной РНК, занимая слишком много белков ADAR1 или ADAR2. Поэтому авторы изобретения проанализировали сайты

редактирования РНК А-в-I, общие для контрольной группы и группы агРНК₁₅₁-PPIB из результатов секвенирования РНК в масштабе всего транскриптома, а также было проанализировано сравнение между контрольной группой и группой Ctrl РНК₁₅₁. Ни группа Ctrl РНК₁₅₁, ни группа агРНК₁₅₁-PPIB не показали значимых различий по сравнению с контрольной группой (Фиг. 22А, В), что указывает на то, что LEAPER мало влиял на нормальную функцию эндогенного ADAR1, чтобы катализировать нативные события редактирования А-в-I.

[00268] Между тем, авторы изобретения выполнили анализ дифференциальной экспрессии генов с применением данных секвенирования РНК, чтобы проверить, влияет ли агРНК на глобальную экспрессию генов. Авторами изобретения было обнаружено, что ни Ctrl РНК₁₅₁, ни агРНК₁₅₁-PPIB не влияли на глобальную экспрессию гена по сравнению с контрольной группой (фиг. 22С, D). В соответствии с предыдущим наблюдением (фиг. 18А), агРНК не проявляли какого-либо влияния РНКи на экспрессию PPIB (фиг. 22С, D).

[00269] Учитывая, что агРНК образует дуплекс РНК с транскриптом-мишенью, и что дуплекс РНК может вызывать врожденный иммунный ответ, авторы изобретения исследовали, имеет ли введение агРНК такой эффект. Чтобы проверить это, выбрали агРНК, нацеленные на транскрипты четырех генов, эффективность которых была доказана. Авторы изобретения не наблюдали какой-либо индукции мРНК интерферона-β (IFN-β) (фиг. 22Е) или интерлейкина-6 (IL-6) (фиг. 22F), которые являются двумя отличительными признаками активации врожденного иммунитета. В качестве положительного контроля синтетический аналог двухцепочечной РНК – поли(I:C) индуцировал сильную экспрессию IFN-β и IL-6 (фиг. 22Е, f). LEAPER, по-видимому, не индуцирует иммуногенность в клетках-мишенях, что важно для безопасной терапии.

Пример 12. Восстановление транскрипционной регуляторной активности p53 с помощью LEAPER.

[00270] Теперь, когда разработан новый способ редактирования РНК без необходимости введения чужеродных белков, авторы изобретения попытались продемонстрировать его терапевтическую полезность. Авторы изобретения сначала нацелились на ген-супрессор опухолей TP53, который, как известно, играет жизненно важную роль в поддержании клеточного гомеостаза, но претерпевает частые мутации в более 50 % случаев рака у человека⁴⁶. Мутация с.158G>А в TP53 является клинически значимой нонсенс-мутацией (Trp53Ter), приводящей к нефункциональному усеченному белку⁴⁶. Была разработана одна агРНК₁₁₁ и две альтернативные агРНК (агРНК₁₁₁-AG1 и агРНК₁₁₁-AG4) (последовательности агРНК и контрольные РНК по настоящему изобретению, как указано выше), все нацелены на транскрипты TP53^{W53X} (фиг. 23А),

причем последние две предназначены для минимизации потенциальных нецелевых. Авторы изобретения создали клеточную линию НЕК293Т TP53^{-/-} для устранения эффектов нативного белка p53. Все три формы нацеленных на TP53^{W53X} агРНК конвертировали примерно от 25 до 35 % транскриптов TP53^{W53X} на мутированном аденозиновом сайте (фиг. 23B) с переменным сокращением нежелательных изменений для агРНК₁₁₁-AG1 и агРНК₁₁₁-AG4 (фиг. 24). Вестерн-блоттинг показал, что все агРНК₁₁₁, агРНК₁₁₁-AG1 и агРНК₁₁₁-AG4 могут сохранить продукцию полноразмерного белка p53 на основе транскриптов TP53^{W53X} в клетках НЕК293Т TP53^{-/-}, в то время как Ctrl РНК₁₁₁ не может (фиг. 23C).

[00271] Чтобы проверить, являются ли восстановленные белки p53 полностью функциональными, проверили транскрипционную регуляторную активность p53 с помощью цис-репортерной системы p53-люцифераза^{47,48}. Все три версии агРНК могли восстанавливать активность p53, и оптимизированная версия агРНК₁₁₁-AG1 показала наилучшие результаты (фиг. 23D). В заключении авторами изобретения продемонстрировано, что LEAPER способен восстанавливать релевантный для рака преждевременный стоп-кодон TP53 и восстанавливать его функцию.

Пример 13. Коррекция патогенных мутаций с помощью LEAPER.

[00272] Авторами изобретения затем было исследовано, можно ли применять LEAPER для коррекции большего количества патогенных мутаций. При нацеливании на клинически значимые мутации шести патогенных генов, COL3A1 синдрома Элерса-Данло, BMPR2 первичной легочной гипертензии, ANH1 синдрома Жубера, FANCC анемии Фанкони, MYBPC3 первичной наследственной гипертрофической кардиомиопатии и IL2RG X-сцепленного тяжелого комбинированного иммунодефицита, сконструировали 111-нуклеотидные (111-nt) агРНК для каждого из этих генов, несущие соответствующие патогенные мутации G>A (фиг. 25 и последовательности агРНК и контрольных РНК по настоящему изобретению, как указано выше, а соответствующие болезни кДНК, примененные в настоящем исследовании, показаны в таблице 4).

Таблица 4. кДНК, связанные с заболеванием, примененные в настоящем исследовании

Кандидат	Заболевание	Мутантный аденозин
NM_000090.3 (COL3A1)	Синдром Элерса-Данлоса, тип 4	c.3833G>A (p.Trp1278Ter)
NM_001204.6 (BMPR2)	Первичная легочная гипертензия	c.893G>A (p.Trp298Ter)
NM_017651.4	Синдром Жубера 3	c.2174G>A

(AHL1)		(p.Trp725Ter)
NM_000136.2 (FANCC)	Анемия Фанкони, группа комплементации С	c.1517G>A (p.Trp506Ter)
NM_000256.3 (MYBPC3)	Первичная семейная гипертрофическая кардиомиопатия	c.3293G>A (p.Trp1098Ter)
NM_000206.2 (IL2RG)	Х-сцепленный тяжелый комбинированный иммунодефицит	c.710G>A (p.Trp237Ter)

[00273] Путем совместной экспрессии пар агРНК/кДНК в клетках HEK293T были идентифицированы значительные количества транскриптов-мишеней с коррекцией A>G во всех тестах (фиг. 24). Поскольку мутации G>A составляют почти половину известных точечных мутаций, вызывающих заболевание у людей^{10,49}, преобразование A>G с помощью LEAPER может открыть огромные возможности для лечения.

Пример 14. Редактирование РНК в нескольких первичных клетках человека с помощью LEAPER.

[00274] Для дальнейшего изучения клинической применимости LEAPER было решено протестировать способ на нескольких первичных клетках человека. Во-первых, протестировали LEAPER на первичных легочных фибробластах человека и первичных бронхиальных эпителиальных клетках человека с агРНК из 151 нуклеотидов (151-nt агРНК) (последовательности агРНК и контрольных РНК по настоящему изобретению, как указано выше) для редактирования Репортера-1 (фиг. 15A). От 35 до 45 % EGFP-положительных клеток можно было получить с помощью LEAPER в обеих первичных клетках человека (фиг. 27A). Затем протестировали LEAPER при редактировании эндогенного гена PPIB в этих двух первичных клетках и первичных Т-клетках человека и обнаружили, что агРНК₁₅₁-PPIB может достигать более 40 %, более 80 % и более 30 % скорости редактирования в первичных легочных фибробластах человека, в первичных бронхиальных эпителиальных клетках (фиг. 27B) и первичных Т-клетках (фиг. 27C) соответственно. Высокая эффективность редактирования LEAPER в первичных клетках человека особенно обнадеживает в отношении его потенциального применения в терапии.

Пример 15. Эффективное редактирование с помощью лентивирусной экспрессии и химического синтеза агРНК.

[00275] Затем авторы изобретения исследовали, можно ли доставить LEAPER более клинически значимыми способами. Сначала проверили действие агРНК через экспрессию на основе лентивируса. Нацеленная на репортер-1 агРНК₁₅₁ индуцировала сильную экспрессию EGFP в более чем 40 % всех клеток, несущих репортер-1, в клетках HEK293T

через 2 дня после заражения (dpi, точек на дюйм). При 8 dpi соотношение EGFP поддерживалось на сопоставимом уровне примерно 38 % (фиг. 28А и последовательности агРНК и контрольных РНК, по настоящему изобретению, как указано выше), что предполагает, что LEAPER может быть адаптирован к терапевтическим средствам, требующим непрерывного введения. Для редактирования нативного гена авторы изобретения доставили нацеленный на PPIB агРНК₁₅₁ посредством лентивирусной трансдукции в клетки HEK293Т и наблюдали более 6 % редактирования мишени при 6 dpi (фиг. 28В).

[00276] Затем протестировали синтезированные олигонуклеотиды агРНК и способ доставки электропорации для LEAPER. 111-нуклеотидная (111-nt) агРНК, нацеленная на транскрипты PPIB, а также Ctrl РНК были синтезированы химическим путем с 2'-О-метилированием и фосфоротиоатной связью в первых трех и последних трех нуклеотидах агРНК (фиг. 28С). После введения в Т-клетки посредством электропорации олигонуклеотиды агРНК₁₁₁-PPIB достигли примерно 20 % редактирования транскриптов PPIB (фиг. 28D), что указывает на перспективность LEAPER для разработки олигонуклеотидных лекарственных средств.

Пример 16. Восстановление активности α -L-идуронидазы в первичных фибробластах, полученных от пациента с синдромом Гурлера, с помощью LEAPER.

[00277] Наконец, авторы изобретения исследовали потенциал LEAPER в лечении моногенетического заболевания, синдрома Гурлера, наиболее тяжелого подтипа мукополисахаридоза I типа (MPS I) из-за дефицита α -L-идуронидазы (IDUA), лизосомного метаболического фермента, ответственного за деградацию мукополисахаридов⁵⁰. Был выбран первичный фибробласт GM06214, который первоначально выделили от пациента с синдромом Гурлера. Клетки GM06214 содержат гомозиготную мутацию TGG>TAG в экзоне 9 гена IDUA, что приводит к мутации Trp402Ter в белке. Были разработаны две версии агРНК с помощью синтезированных олигонуклеотидов РНК с химическими модификациями 2'-О-метилирования и межнуклеотидных фосфоротиатных связей в первых и последних 3 нуклеотидах последовательностей, агРНК₁₁₁-IDUA-V1 и агРНК₁₁₁-IDUA-V2, нацеленных на зрелую мРНК и пре-мРНК IDUA, соответственно (фиг. 29А и последовательности агРНК и контрольных РНК по настоящему изобретению, как указано выше). После введения агРНК₁₁₁-IDUA-V1 или агРНК₁₁₁-IDUA-V2 в клетки GM06214 посредством электропорации авторы изобретения измерили целевые скорости редактирования РНК с помощью анализа NGS и каталитическую активность α -L-идуронидазы с субстратом 4-MU- α -L-идуронидазы в разные моменты времени. Как агРНК₁₁₁-IDUA-V1, так и агРНК₁₁₁-IDUA-V2 значительно восстанавливали каталитическую

активность IDUA в IDUA-дефицитных клетках GM06214 постепенно со временем после электропорации, а agPHK₁₁₁-IDUA-V2 работал намного лучше, чем agPHK₁₁₁-IDUA-V1, в то время как активность α -L-идуронидазы можно было обнаружить в трех контрольных группах (фиг. 29B).

[00278] Для дальнейшей оценки степени, в которой восстановленная активность IDUA в GM06214 с помощью LEAPER облегчает синдром Гурлера, исследовали активность IDUA в клетках GM01323, других первичных фибробластах пациента с синдромом Шейе, гораздо более мягким подтипом MPS I, чем синдром Гурлера из-за остаточной активности IDUA в результате гетерозиготного генотипа по гену IDUA. Авторами изобретения было обнаружено, что каталитическая активность IDUA в клетках GM06214, несущих agPHK₁₁₁-IDUA-V2, была выше, чем у клеток GM01323, через 48 часов после электропорации (фиг. 29B). В соответствии с этими результатами, анализ NGS показал, что agPHK₁₁₁-IDUA-V2 преобразовал примерно 30 % редактирования A в I, что намного выше, чем у agPHK₁₁₁-IDUA-V1 (фиг. 29C). Дальнейший анализ показал, что минимальные нежелательные изменения были обнаружены в областях, покрытых agPHK, транскриптов IDUA (фиг. 29D). Важно отметить, что LEAPER не запускал иммунные ответы в первичных клетках, поскольку в настоящем изобретении продемонстрировано, что, в отличие от дуплекса РНК поли(I:C), служащего положительным контролем, ни agPHK₁₁₁-IDUA-V1, ни agPHK₁₁₁-IDUA-V2 не индуцировали экспрессию панели генов, участвующих в интерфероне I типа и провоспалительных ответах (фиг. 29E). Эти результаты показали терапевтический потенциал LEAPER в борьбе с некоторыми моногенетическими заболеваниями.

Пример 17. Обнаружение мутантного генотипа GM06214.

[00279] Клетки GM06214 культивировали в среде для культивирования фибробластов (ScienCell, среда FM, кат. № 2301), содержащей 15 % сыворотки и 1 % добавки для роста фибробластов (ScienCell, GFS, кат. № 2301), в инкубаторе при 37 °C и 5% CO₂, в течение 2-3 дней. Когда клетки конфлюэнтны на 90 %, они перевариваются 0,25% трипсином, затем переваривание останавливают средой для культивирования фибробластов, содержащей 15 % сыворотки. Экстракцию ДНК проводили с применением набора для экстракции клеточной ДНК TianGene® (TIANGEN Biotech (Beijing) Co., Ltd.) (Кат. № DP304-03) в соответствии с инструкциями по эксплуатации.

[00280] Праймеры для последовательностей перед и после сайта мутации IDUA были сконструированы с применением NCBI-Primer blast (сайт в сети Интернет: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). SEQ ID NO: 304: CGCTTCCAGGTCAACAACAC (прямой праймер hIDUA-F1), SEQ ID NO 305: CTCGCGTAGATCAGCACCG (обратный праймер hIDUA-R1). Была проведена ПЦР, и

продукты ПЦР подвергали секвенированию по Сэнгеру. Как показано на фиг. 34, подтверждено, что мутация клеток представляет собой мутацию G в A, которая приводит к заболеванию.

Пример 18. Тест условий трансфекции клеток GM06214.

[00281] Клетки GM06214 переваривали при 90% конфлюэнтности GM06214 и подсчитывали после прекращения переваривания. Для электротрансфекции 6 миллионов клеток ресуспендировали с 400 мкл предварительно смешанного раствора для электротрансфекции (Lonza, кат. № V4XP-3024) и добавляли 20 мкг плазмиды GFP (Lonza, кат. № V4XP-3024). После перемешивания 20 мкл суспензии применяют в качестве системы электротрансфекции для проверки каждого из 8 условий, включая 7 тестов условий электротрансфекции (см. фиг. 35) и один отрицательный контроль, с помощью прибора Lonza Nucleofector™. Проверка каждого условия дублируется. После электротрансфекции клетки быстро переносят в 2 мл среды для культивирования фибробластов (ScienCell, среда FM, кат. № 2301), содержащей 15 % сыворотки. Клетки для каждого условия помещали в 2 лунки (6-луночные планшеты для культивирования) и культивировали в инкубаторе с 5% CO₂ и 37 °C. Через 24 часа после электротрансфекции клетки в одной из 2 лунок каждого условия электротрансфекции переваривали, и долю GFP-положительных клеток измеряли с помощью проточной цитометрии. Через 48 часов после электротрансфекции клетки в другой лунке из 2 лунок каждого условия электротрансфекции переваривали, и долю GFP-положительных клеток измеряли с помощью проточной цитометрии. Оптимальными условиями электротрансфекции для клеток являются условия CA-137, как показано на фиг. 35.

Пример 19. Определение ферментативной активности IDUA и частоты мутаций A в G.

[00282] Олиго-dPHK сконструированы и синтезированы для нацеливания на последовательность с сайтом мутации пре-mPHK и зрелой РНК, транскриптируемой из гена IDUA. Последовательность dPHK показана следующим образом. Все последовательности dPHK были модифицированы по паттерну CM0 (2'-О-метилование было в первых и последних 3 нуклеотидах последовательностей, а первые и последние 3 межнуклеотидные связи в последовательностях были фосфотизированы).

[00283] SEQ ID NO 204:
gacgcccaccgugugguugcuguccaggacggucccgccugcgacacuuaggccagagcugcuccucauccagcagcgcca
gcagcccauggccgugagcaccggcuu (пре-55нт-с-55нт),

[00284] SEQ ID NO 205:
gacgcccaccgugugguugcuguccaggacggucccgccugcgacacuuaggccagagcugcuccucaucugcgggggcg

ggggggggccgucgccgcguggggucguug (м-55нт-с-55нт),

[00285]

SEQ

ID

NO

341:

uaccgcuacagccacgcugauuucagcuauaccugccccgguaauaaagggaacguucacaccggauguuciscgcggggaauac
gsgauucaggauuaaaagaaguc (случайная-111нт).

[00286] Где основание, соответствующее мутированному основанию в синтезированной dPHK, представляет собой C, образует ошибку спаривания A-C с мутированным основанием при связывании. Длина синтезированной dPHK предпочтительно составляет 111 нт. Клетки подвергали электротрансфекции с применением оптимальных условий электротрансфекции, полученных в примере 2. Через 48 часов после электротрансфекции клетки собирали для определения ферментативной активности и определения частоты мутации A в G.

Определение частоты мутаций A в G:

[00287] Разработанную dPHK растворяли до необходимой концентрации в воде, свободной от РНКазы (TransGene Biotech, кат. № GI201-01), и хранили при минус 80 °С. Клетки переваривали, когда клетки GM06214 выросли до примерно 90% конфлюэнтности, и считали после прекращения переваривания. 1 миллион клеток и 200 пмоль dPHK смешивали и разводили до 100 мкл, а затем подвергали электротрансфекции в условиях CA-137. Через 48 часов после электротрансфекции клетки подсчитывали и измеряли их жизнеспособность. Клетки переносили в центрифужную пробирку без РНКазы и центрифугировали. Супернатант отбрасывали. РНК экстрагировали с применением набора для экстракции РНК QIAGEN (QIAGEN, кат. № 74134). Согласно инструкциям, 0,35 мл буфера RLT Plus смешали с 5×10^5 клеток (если РНК экстрагируется непосредственно из замороженных клеток, рекомендуется однократно промыть клетки PBS) с помощью пипетки. Лизат клеток переносили на спин-колонку gDNA Eliminator и центрифугировали при ≥ 8000 g в течение 30 с. Колонку отбрасывали, а жидкость оставляли. Добавляли такой же объем 70 % этанола в виде жидкости. Сразу после перемешивания смесь переносили в спин-колонку RNeasyMinElute и центрифугировали при ≥ 8000 g в течение 15 с и отработанную жидкость отбрасывали. 700 мкл буфера RW1 добавляли в спин-колонку RNeasyMinElute и центрифугировали при ≥ 8000 g в течение 15 с. Отработанный раствор отбрасывали и добавляли 500 мкл буфера RPE, а затем центрифугировали спин-колонку RNeasyMinElute при ≥ 8000 g в течение 15 с. Отработанный раствор отбрасывали и добавляли 500 мкл 80 % этанола, а затем центрифугировали спин-колонку RNeasyMinElute при ≥ 8000 g в течение 2 минут. Отработанный раствор отбрасывали. Спин-колонку RNeasyMinElute помещали в новую сборную колонку объемом 2 мл и центрифугировали с крышкой на максимальной скорости в течение 5 минут для сушки колонки. Спин-колонку

RNeasyMinElute помещали в новую сборную колонку объемом 1,5 мл и к центру мембраны колонки по каплям добавляли 14 мкл воды, не содержащей РНКазы, затем колонки центрифугировали на максимальной скорости в течение 1 минуты для элюирования РНК.

[00288] Соответствие экстрагированной РНК определяли с помощью Nanodrop (Thermo, Nanodrop2000), и 1 мкг РНК применяли для обратной транскрипции (Thermo, обратная транскриптаза, кат. № 28025013). Система обратной транскрипции показана в таблице 5-6. После инкубации при 65 °С в течение 5 минут систему обратной транскрипции немедленно охлаждали на ледяной бане. Инкубацию продолжали при 37 °С в течение 50 минут. Обратная транскриптаза инактивировали при 70 °С в течение 15 минут. ПЦР выполняли в условиях, показанных в таблице 7. После ПЦР 2 мкл ПЦР продукта проверяли электрофорезом в агарозном геле. По результатам электрофореза определяли концентрацию продукта ПЦР и правильность размера полосы. После очистки продукты ПЦР применяли для подготовки библиотеки, которую отправляли на секвенирование следующего поколения.

[00289] Таблица 5. Система обратной транскрипции-1

	Объем (мкл)
Общая РНК (1 мкг)	X
Олиго dT	1
10 нМ dNTP	1
Вода, не содержащая РНКаз	10-X
Общий объем	12

65 °С, 5 мин, и сразу перенос на лед.

[00290] Таблица 6. Система обратной транскрипции-2

	Объем (мкл)
Продукт из Таблицы 5	12 мкл
5X буфер для синтеза первой цепи	4
0,1 М ДТТ (дитиотрейтол)	2
Рекомбинантный ингибитор рибонуклеазы RNaseOUT™	1
M-MLV	1
Общий объем	20

[00291] Таблица 7. Условия ПЦР

Стадии	Время	Цикл
98 °C	2 мин	1 цикл
98 °C	15 с	28-35 циклов
63 °C	30 с	
72 °C	15 с	
72 °C	2 мин	1 цикл

Анализ ферментативной активности в указанном примере:

[00292] Клетки GM06214 переваривали, центрифугировали и ресуспендировали в 28 мкл $1 \times$ PBS, содержащего 0,1% тритона X-100, и лизировали на льду в течение 30 минут. Затем 25 мкл клеточного лизата добавляли к 25 мкл субстрата, содержащего 190 мкм 4-метилумбеллиферил- α -L-идуронидазы (Cayman, 2A-19543-500, растворенный в 0,4 М буфере формиата натрия, содержащем 0,2% тритона X-100, pH 3,5) и инкубировали в темноте при 37 °C в течение 90 минут. Для инактивации каталитической реакции добавляли 200 мкл 0,5 М раствора NaOH/глицина (Beijing Chemical Works, NaOH, кат. № AR500G, Solarbio, глицин, кат. № G8200), pH 10,3. После центрифугирования при 4 °C в течение 2 минут супернатант переносили в 96-луночный планшет для определения значений флуоресценции с помощью прибора Infinite M200 (TECAN). Длина волны возбуждающего света составляла 365 и 450 нм. Флуоресценция представляет ферментативную активность, которая на фигурах выражена как кратная ферментативной активности в GM01323.

[00293] Как показано на фиг. 36, результаты показали, что dPНК, нацеленная на пре-mPНК, приводит к значительно более высокой ферментативной активности и частоте мутации А в G, чем те, которые нацелены на зрелую mPНК. Следовательно, dPНК, применяемые в следующих примерах, нацелены на пре-mPНК.

Пример 20. Определение эффективности редактирования в линии репортерных клеток IDUA после электротрансфекции химически модифицированной dPНК.

[00294] Как показано на фиг. 37A, плазмиду конструировали путем вставки последовательности с сайтом мутации IDUA, фланкированным примерно 100 п.н. с каждой стороны, соответственно, между последовательностями, экспрессирующими белки mcherry и GFP, на лентивирусной плазмиде. Сконструированные плазмиды были упакованы в вирусы, которые позже применяли для заражения клеток 293T. После интеграции в геном были отобраны моноклональные клетки-репортеры IDUA. Поскольку на моноклональные клетки воздействовал стоп-кодон TAG сайта мутации IDUA во вставленной последовательности, они экспрессировали только белок mcherry. Когда клетки редактируются dPНК, GFP за TAG, который затем был мутирован в TGG, может нормально

экспрессироваться. Таким образом, экспрессия GFP рассматривалась как эффективность редактирования dPHK в клетках. Были сконструированы 4 предпочтительных dPHK с различной длиной от 51 до 111 нт, как показано в Таблице 8 ниже. Все последовательности dPHK были модифицированы по паттерну CM0. Клетки подвергали электротрансфекции dPHK различной длины в условиях электротрансфекции в примере 18. Каждый день с 1-го по 7-й день после трансфекции эффективность редактирования предварительно оценивали, определяя соотношение GFP в клетках. Как показано на фиг. 37В, пик эффективности редактирования пришелся на вторые сутки (48ч). Последовательность с более высокой эффективностью редактирования представляла собой 91нт: 45-с-45, что выше, чем у 111нт: 55-с-55. Соответственно, не во всех случаях, чем длиннее dPHK, тем выше эффективность редактирования. Кроме того, эффективность редактирования dPHK 51нт была очень низкой.

Таблица 8.

111нт- случайная (111nt- случайная)	SEQ ID NO: 140 : uaccgcuacagccacgcugauuucagcuauaccugcccgguaauaaagggacguucacaccgcgauguucu cugcugggggaauugcgcgauauucaggauuaaagaagugc
91нт- случайная (91nt- случайная)	SEQ ID NO: 342 : uaauccugaauaucgcgcaauucccagcagagaacaucgcggugugaacguccuuuauaccgggcagg uauagcugaaauacgcguggc
71нт- случайная (71nt- случайная)	SEQ ID NO: 343 : uuucagcuauaccugcccgguaauaaagggacguucacaccgcgauguucucugcugggggaauugcgcgau ua
51нт- случайная (51nt- случайная)	SEQ ID NO 8 : uuccccagcagagaacaucgcggugugaacguccuuuauaccgggcaggu
55нт-с-55нт	SEQ ID NO: 205 : gacgcccaccgugugguugcuguccaggacggucccgccugcgacacuucggcccagagcugcuccuc aucugcgggggcgggggggggccgucgccgcguggggucguug
45нт-с-45нт	SEQ ID NO: 344 :

	gugugguugcuguccaggacggucccgccugcgacacuuucggcccagagcugcuccucaucugcgggg cgggggggggccgucgcccgu
35нт-с-35нт	SEQ ID NO: 345 : uguccaggacggucccgccugcgacacuuucggcccagagcugcuccucaucugcgggggcggggggggg cc
25нт-с-25нт	SEQ ID NO: 346 : ggucccgccugcgacacuuucggcccagagcugcuccucaucugcgggggcg

Пример 21. Определение внутриклеточной активности фермента IDUA и эффективности редактирования РНК в клетках GM06214 в различные моменты времени после трансфекции химически модифицированными dРНК различной длины.

[00295] Применяли условия из примера 18 (см. Таблицу 7) для электротрансфекции dРНК разной длины в клетки GM06214 и способы из примера 19 для определения активности фермента и эффективности редактирования. На 2-й, 4-й, 6-й, 8-й, 10-й, 12-й и 14-й дни после электротрансфекции тестировали внутриклеточную ферментативную активность, а на 2-й и 4-й день определяли эффективность редактирования РНК в клетках. Как показано на фиг. 38А, 91нт: 45-с-45 приводил к высокой активности фермента, а активность фермента IDUA поддерживалась на высоком уровне до 6-го дня после электротрансфекции. На фиг. 38В, dРНК из 91нт и dРНК из 111нт показали примерно одинаковую эффективность редактирования. Опять же, dРНК из 51нт показала низкую эффективность редактирования.

Пример 22. Скрининг предпочтительных последовательностей химически модифицированных dРНК.

[00296] На основании предшествующего уровня техники, авторы изобретения полагают, что электротрансфекция не подходит для лечения заболеваний в будущем. Таким образом в настоящем изобретении электротрансфекцию преобразована в липофектамин RNAiMAX ((Invitrogen, Cat. No. 13778-150)) для трансфекции dРНК в клетки. Оказалось, что липофектамин RNAiMAX имеет более высокую эффективность трансфекции, чем электротрансфекция. Последовательность сначала была усечена на обоих концах одновременно, а затем один конец последовательности был зафиксирован, а другой конец был усечен. Таким образом получают 14 dРНК и 4 случайные последовательности равной длины, как показано в Таблице 9 ниже. Все последовательности dРНК были модифицированы по паттерну CM0. Как показано на фиг. 39, активность фермента IDUA (фиг. 39А, с применением способа, описанного в примере 19) и эффективность редактирования РНК (фиг. 39В, с применением NGS) определяли через 48 часов после трансфекции. Активность фермента IDUA и эффективность редактирования РНК,

определяемые 81нт: 55-с-25 (SEQ ID NO 24) и 71нт: 55-с-15 (SEQ ID NO 25), оказались выше, чем у других dPHK. PHK с более коротким 3'-концом и более длинным 5'-концом всегда имела более высокую эффективность. Кроме того, похоже, что эффективность редактирования dPHK резко снизилась, когда ее длина была уменьшена до 61нт или менее, независимо от того, как изменился 3'- или 5'-конец.

Таблица 9.

111нт-случайная	SEQ ID NO:140 : uaccgcuacagccacgcugauuucagcuauaccugccccgguaauaaagggacguucacaccgcgauguucucugcugggggaauugcgcgauauucaggauuaaagaagugc
91нт-случайная	SEQ ID NO: 342 : uaauccugaauaucgcgcaauuccccagcagagaacaucgcggugugaacguccuuuauaccgggcagguaauagcugaaauacgcguggc
71нт-случайная	SEQ ID NO: 343 : uuucagcuauaccugccccgguaauaaagggacguucacaccgcgauguucucugcugggggaauugcgcgaua
51нт-случайная	SEQ ID NO 8 : uccccagcagagaacaucgcggugugaacguccuuuauaccgggcaggu
55нт-с-55нт	SEQ ID NO: 205 : gacgcccaccgugugguugcuguccaggacggucccgccugcgacacuucggcccagagcugcuccucaucugcgggggcgggggggggccgucgcccgcguggggucguug
45нт-с-45нт	SEQ ID NO: 344 : gugugguugcuguccaggacggucccgccugcgacacuucggcccagagcugcuccucaucugcgggggcgggggggggccgucgcccgcgu
35нт-с-35нт	SEQ ID NO: 345 : uguccaggacggucccgccugcgacacuucggcccagagcugcuccucaucugcgggggcgggggggggcc
25нт-с-25нт	SEQ ID NO: 346 : ggucccgccugcgacacuucggcccagagcugcuccucaucugcgggggcg
55нт-с-45нт	SEQ ID NO: 347 : gacgcccaccgugugguugcuguccaggacggucccgccugcgacacuucggcccagagcugcuccucaucugcgggggcgggggggggccgucgcccgcgu
55нт-с-35нт	SEQ ID NO: 348 : gacgcccaccgugugguugcuguccaggacggucccgccugcgacacuucggcccagagcugcuccucaucugcgggggcgggggggggcc

55нт-с-25нт	SEQ ID NO: 349 : gacgcccaccgugugguugcuguccaggacggucccgccugcgacacuucggcccagagcugcuccuc aucugcggggcg
55нт-с-15нт	SEQ ID NO: 350 : gacgcccaccgugugguugcuguccaggacggucccgccugcgacacuucggcccagagcugcuccuc au
55нт-с-5нт	SEQ ID NO: 351 : gacgcccaccgugugguugcuguccaggacggucccgccugcgacacuucggcccagagc
45нт-с-55нт	SEQ ID NO: 352 : gugugguugcuguccaggacggucccgccugcgacacuucggcccagagcugcuccucaucugcgggg cgggggggggcgucgccgcguggggucguug
35нт-с-55нт	SEQ ID NO: 353 : uguccaggacggucccgccugcgacacuucggcccagagcugcuccucaucugcgggggcggggggggg ccgucgccgcguggggucguug
25нт-с-55нт	SEQ ID NO: 354 : ggucccgccugcgacacuucggcccagagcugcuccucaucugcgggggcgggggggggcgucgccgc guggggucguug
15нт-с-55нт	SEQ ID NO: 355 : ugcgacacuucggcccagagcugcuccucaucugcgggggcgggggggggcgucgccgcguggggucg uug
5нт-с-55нт	SEQ ID NO: 356 : cgcccagagcugcuccucaucugcgggggcgggggggggcgucgccgcguggggucguug

Пример 23. Определение необязательной длины 3'-конца химически модифицированной dPHK.

[00297] В примере 22 более высокая ферментативная активность IDUA и эффективность редактирования были обнаружены в клетках, редактируемых dPHK с последовательностями 81нт: 55-с-25 и 71нт: 55-с-15. Чтобы определить самую короткую и оптимальную длину 3'-конца, последовательность на 3'-конце была усечена с 25 нт (81нт: 55-с-25) до 5 нт (61нт: 55-с-5), как показано в Таблице 10. Все последовательности dPHK были модифицированы по паттерну CM0. Два анализа ферментативной активности IDUA проводили на клетках, отдельно трансфицированных dPHK от 81 нт: 55-с-25 до 66нт: 55-с-10 (фиг. 40А), и клетках, отдельно трансфицированных dPHK от 72 нт: 55-с-16 до 61нт: 55-с-5 (фиг. 40В). dPHK с длиной 3'-конца от 25 до 9 нт легко повышали ферментативную

активность в клетках GM06214 более чем в 20 раз по сравнению с клетками GM0123. Соответственно, оптимальная длина 3'-конца составляла от 25 до 7 нт. Кроме того, по сравнению с 45нт-с-45нт (45nt-c-45nt), имеющим равную длину 3'- и 5'-концов, dPHK с более короткими 3'-концами всегда имел более высокую эффективность редактирования.

[00298] Анализ ферментативной активности IDUA, применяемый в настоящем изобретении, описан ниже. За день до трансфекции 3×10^5 клеток на лунку высевали в 6-луночный планшет. Среду обновляли в день трансфекции. Через 48 часов после трансфекции с применением 20 нМ реагента липофектамина RNAiMAX клетки GM06214 переваривали, центрифугировали и ресуспендировали в 33 мкл $1 \times$ PBS, содержащего 0,1% Triton X-100, и лизировали на льду в течение 30 минут. Затем лизат центрифугировали при 4 °C в течение 2 минут. 25 мкл клеточного лизата добавляли к 25 мкл субстрата, содержащего 190 мкМ 4-метилумбеллиферил- α -L-идуронидазы (Glycosynth, 44076), растворенной в 0,4 М натрийформатном буфере, содержащем 0,2% Triton X-100. (pH 3,5), и инкубировали в темноте при 37 °C в течение 30 минут. Для инактивации каталитической реакции добавляли 200 мкл 0,5 М раствора NaOH/глицина (Beijing Chemical Works, NaOH, кат. № AR500G, Solarbio, Glycine, кат. № G8200), pH 10,3. Весь супернатант был обнаружен с помощью прибора Infinite M200 (TECAN). Длина волны возбуждающего света составляла 365 нм и 450 нм. Ферментативная активность выражалась как кратная ферментативной активности в GM01323.

Таблица 10.

55нт-с- 25нт	SEQ ID NO: 349 : gacgccaccgugugguugcuguccaggacggucccgccugcgacaciuccggcccagagcugcuccuca ucugcggggcg
55нт-с- 24нт	SEQ ID NO: 357 : gacgccaccgugugguugcuguccaggacggucccgccugcgacaciuccggcccagagcugcuccuca ucugcggggc
55нт-с- 23нт	SEQ ID NO: 358 : gacgccaccgugugguugcuguccaggacggucccgccugcgacaciuccggcccagagcugcuccuca ucugcgggg
55нт-с- 22нт	SEQ ID NO: 359 : gacgccaccgugugguugcuguccaggacggucccgccugcgacaciuccggcccagagcugcuccuca ucugcggg
55нт-с-	SEQ ID NO: 360 :

21HT	gacgcccaccgugugguugcuguccaggacggucccgccugcgacacuucggcccagagcugcuccuca ucugcgg
55HT-c- 20HT	SEQ ID NO: 361 : gacgcccaccgugugguugcuguccaggacggucccgccugcgacacuucggcccagagcugcuccuca ucugcgg
55HT-c- 19HT	SEQ ID NO: 362 : gacgcccaccgugugguugcuguccaggacggucccgccugcgacacuucggcccagagcugcuccuca ucugc
55HT-c- 18HT	SEQ ID NO: 363 : gacgcccaccgugugguugcuguccaggacggucccgccugcgacacuucggcccagagcugcuccuca ucug
55HT-c- 17HT	SEQ ID NO: 364 : gacgcccaccgugugguugcuguccaggacggucccgccugcgacacuucggcccagagcugcuccuca ucu
55HT-c- 16HT	SEQ ID NO: 365 : gacgcccaccgugugguugcuguccaggacggucccgccugcgacacuucggcccagagcugcuccuca uc
55HT-c- 15HT	SEQ ID NO: 350 : gacgcccaccgugugguugcuguccaggacggucccgccugcgacacuucggcccagagcugcuccuca u
55HT-c- 14HT	SEQ ID NO: 366 : gacgcccaccgugugguugcuguccaggacggucccgccugcgacacuucggcccagagcugcuccuca
55HT-c- 13HT	SEQ ID NO: 367 : gacgcccaccgugugguugcuguccaggacggucccgccugcgacacuucggcccagagcugcuccuc
55HT-c- 12HT	SEQ ID NO: 368 : gacgcccaccgugugguugcuguccaggacggucccgccugcgacacuucggcccagagcugcuccu
55HT-c- 11HT	SEQ ID NO: 369 : gacgcccaccgugugguugcuguccaggacggucccgccugcgacacuucggcccagagcugcucc
55HT-c- 10HT	SEQ ID NO: 370 : gacgcccaccgugugguugcuguccaggacggucccgccugcgacacuucggcccagagcugcuc
55HT-c- 9HT	SEQ ID NO: 371: gacgcccaccgugugguugcuguccaggacggucccgccugcgacacuucggcccagagcugcu
55HT-c-	SEQ ID NO: 372:

8нт	gacgcccaccgugugguugcuguccaggacggucccgccugcgacacuucggcccagagcugc
55нт-с- 7нт	SEQ ID NO: 373: gacgcccaccgugugguugcuguccaggacggucccgccugcgacacuucggcccagagcug
55нт-с- 6нт	SEQ ID NO: 374: gacgcccaccgugugguugcuguccaggacggucccgccugcgacacuucggcccagagcu
55нт-с- 5нт	SEQ ID NO: 375: gacgcccaccgugugguugcuguccaggacggucccgccugcgacacuucggcccagagc
случайная -70нт	SEQ ID NO: 376: uaccgcuacagccacgcugauuucagcuauaccugcccgguaauaaaggacguucacaccgcgauguucu
случайная -67нт	SEQ ID NO: 377: uaccgcuacagccacgcugauuucagcuauaccugcccgguaauaaaggacguucacaccgcgaug

Пример 24. Определение необязательной длины 5'-конца химически модифицированной dPHK, при фиксированной длине ее 3'-конца.

[00299] Усечение 5'-конца проводили отдельно на dPHK двух разных длин: 76нт: 55-с-20 и 71нт: 55-с-15. При фиксированной длине 3'-конца их 5'-концы постепенно усекались, как показано в Таблице 11. Все последовательности dPHK были модифицированы по паттерну CM0. Согласно результатам анализа ферментативной активности IDUA, клетки, которые трансфицировали dPHK с 5'-концами между 55 нт и 45 нт, имели более высокую ферментативную активность IDUA, как показано на фиг. 41. При трансфекции применяли липофектамин RNAiMAX. Согласно фиг. 39, когда длина была уменьшена до менее 61нт, эффективность редактирования dPHK, даже тех, которые имеют неравную длину 3'- и 5'-концов, резко снизилась.

Таблица 11.

55нт-с- 20нт	SEQ ID NO:361 : gacgcccaccgugugguugcuguccaggacggucccgccugcgacacuucggcccagagcugcuccu caucugcg
50нт-с- 20нт	SEQ ID NO : 378 : ccaccgugugguugcuguccaggacggucccgccugcgacacuucggcccagagcugcuccucaucu gcg
45нт-с- 20нт	SEQ ID NO : 379 : gugugguugcuguccaggacggucccgccugcgacacuucggcccagagcugcuccucaucugcg
40нт-с-	SEQ ID NO : 380 :

20нт	guugcuguccaggacgguccggccugcgacacuucggcccagagcugcuccucaucugcg
35нт-с- 20нт	SEQ ID NO : 381 : uguccaggacgguccggccugcgacacuucggcccagagcugcuccucaucugcg
55нт-с- 15нт	SEQ ID NO: 350 : gacgcccaccgugugguugcuguccaggacgguccggccugcgacacuucggcccagagcugcuccucau
50нт-с- 15нт	SEQ ID NO : 382 : ccaccgugugguugcuguccaggacgguccggccugcgacacuucggcccagagcugcuccucau
45нт-с- 15нт	SEQ ID NO : 383 : gugugguugcuguccaggacgguccggccugcgacacuucggcccagagcugcuccucau
40нт-с- 15нт	SEQ ID NO : 384 : guugcuguccaggacgguccggccugcgacacuucggcccagagcugcuccucau
35нт-с- 15нт	SEQ ID NO : 385 : uguccaggacgguccggccugcgacacuucggcccagagcugcuccucau

Пример 27. Определение связи между местоположением целевого нуклеотида и эффективностью редактирования химически модифицированных dPHK с сайтом мутации IDUA

[00300] Согласно приведенным выше данным, эффективность редактирования dPHK связана с длиной и расположением нацеливающего нуклеотида на dPHK. Обычно, чем ближе целевой нуклеотид к 5'-концу, тем ниже эффективность редактирования. Таким образом, в этом примере были сконструированы 3 группы dPHK 3 фиксированных длин. dPHK в каждой группе были сконструированы путем постепенного перемещения целевого нуклеотида от середины последовательности к 5'-концу. Избегают структур, которые нелегко синтезировать. Последовательности показаны в таблице 12. Все последовательности dPHK были модифицированы по паттерну CM0. dPHK трансфицировали в клетки GM06214 с применением липофектамина RNAiMAX. Спустя 48 часов клетки собирали и тестировали ферментативные активности в соответствии со способами, описанными в примере 23. Согласно данным, показанным на фиг. 42, по меньшей мере когда общая длина dPHK была зафиксирована на 67нт, 70нт или 72нт, изменение местоположения целевого нуклеотида, по-видимому, не влияло на ферментативную активность, которая представляла эффективность редактирования.

Таблица 12.

Длин а	Расположе ние С	Номер последоват ельности	Последовательность
67нт непос тоянн ая	55нт-с- 11нт	SEQ ID NO: 369	gacgcccaccgugugguugcuguccaggacggucccgccugcgacac uucggcccagagcugcucc
	54нт-с- 12нт	SEQ ID NO: 386	acgcccaccgugugguugcuguccaggacggucccgccugcgacacu ucggcccagagcugcuccu
	53нт-с- 13нт	SEQ ID NO: 387	cgcccaccgugugguugcuguccaggacggucccgccugcgacacuu cggcccagagcugcuccuc
	52нт-с- 14нт	SEQ ID NO: 388	gcccaccgugugguugcuguccaggacggucccgccugcgacacuuc ggcccagagcugcuccuca
	51нт-с- 15нт	SEQ ID NO: 389	cccaccgugugguugcuguccaggacggucccgccugcgacacuucg gcccagagcugcuccucau
	50нт-с- 16нт	SEQ ID NO: 390	ccaccgugugguugcuguccaggacggucccgccugcgacacuucg gcccagagcugcuccucauc
	49нт-с- 17нт	SEQ ID NO: 391	caccgugugguugcuguccaggacggucccgccugcgacacuucgg cccagagcugcuccucaucu
	48нт-с- 18нт	SEQ ID NO: 392	accgugugguugcuguccaggacggucccgccugcgacacuucggc ccagagcugcuccucaucug
	47нт-с- 19нт	SEQ ID NO: 393	ccgugugguugcuguccaggacggucccgccugcgacacuucggcc cagagcugcuccucaucugc
	46нт-с- 20нт	SEQ ID NO: 394	cgugugguugcuguccaggacggucccgccugcgacacuucggccc agagcugcuccucaucugcg
	45нт-с- 21нт	SEQ ID NO: 395	gugugguugcuguccaggacggucccgccugcgacacuucggccca gagcugcuccucaucugcgg
	44нт-с- 22нт	SEQ ID NO: 396	ugugguugcuguccaggacggucccgccugcgacacuucggcccag agcugcuccucaucugcggg
	43нт-с- 23нт	SEQ ID NO: 397	gugguugcuguccaggacggucccgccugcgacacuucggcccaga gcugcuccucaucugcgggg
70нт непос тоянн ая	55нт-с- 14нт	SEQ ID NO: 366	gacgcccaccgugugguugcuguccaggacggucccgccugcgacac uucggcccagagcugcuccuca
	54нт-с- 15нт	SEQ ID NO: 398	acgcccaccgugugguugcuguccaggacggucccgccugcgacacu ucggcccagagcugcuccucau
	53нт-с-	SEQ ID	cgcccaccgugugguugcuguccaggacggucccgccugcgacacuu

	16НТ	NO: 399	cggcccagagcugcuccucauc
	52НТ-с- 17НТ	SEQ ID NO: 400	gcccaccgugugguugcuguccaggacggucccgccugcgacacuuc ggcccagagcugcuccucaucu
	51НТ-с- 18НТ	SEQ ID NO: 401	cccaccgugugguugcuguccaggacggucccgccugcgacacuucg gcccagagcugcuccucaucug
	50НТ-с- 19НТ	SEQ ID NO: 402	ccaccgugugguugcuguccaggacggucccgccugcgacacuucg gcccagagcugcuccucaucugc
	49НТ-с- 20НТ	SEQ ID NO: 403	caccgugugguugcuguccaggacggucccgccugcgacacuucgg cccagagcugcuccucaucugcg
	48НТ-с- 21НТ	SEQ ID NO: 404	accgugugguugcuguccaggacggucccgccugcgacacuucggc ccagagcugcuccucaucugcgg
	47НТ-с- 22НТ	SEQ ID NO: 405	ccgugugguugcuguccaggacggucccgccugcgacacuucggcc cagagcugcuccucaucugcggg
	46НТ-с- 23НТ	SEQ ID NO: 406	cgugugguugcuguccaggacggucccgccugcgacacuucggccc agagcugcuccucaucugcgggg
72НТ непос тоянно ая	55НТ-с- 16НТ	SEQ ID NO: 365	gacgcccaccgugugguugcuguccaggacggucccgccugcgacac uucggcccagagcugcuccucauc
	54НТ-с- 17НТ	SEQ ID NO: 407	acgcccaccgugugguugcuguccaggacggucccgccugcgacacu ucggcccagagcugcuccucaucu
	53НТ-с- 18НТ	SEQ ID NO: 408	cgcccaccgugugguugcuguccaggacggucccgccugcgacacuu cggcccagagcugcuccucaucug
	52НТ-с- 19НТ	SEQ ID NO: 409	gcccaccgugugguugcuguccaggacggucccgccugcgacacuuc ggcccagagcugcuccucaucugc
	51НТ-с- 20НТ	SEQ ID NO: 410	cccaccgugugguugcuguccaggacggucccgccugcgacacuucg gcccagagcugcuccucaucugcg
	50НТ-с- 21НТ	SEQ ID NO: 411	ccaccgugugguugcuguccaggacggucccgccugcgacacuucg gcccagagcugcuccucaucugcgg
	49НТ-с- 22НТ	SEQ ID NO: 412	caccgugugguugcuguccaggacggucccgccugcgacacuucgg cccagagcugcuccucaucugcggg
	48НТ-с- 23НТ	SEQ ID NO: 413	accgugugguugcuguccaggacggucccgccugcgacacuucggc ccagagcugcuccucaucugcgggg

Пример 28. Влияние химической модификации на эффективность редактирования dPHK.

[00301] Химические модификации синтезированной РНК увеличивают

стабильность РНК и снижают нецелевой потенциал. Относительно распространенными химическими модификациями РНК являются 2'-О-метилование (2'-О-Me) и фосфоротиоатная связь. dРНК с различными комбинациями длин: 71 нт или 76 нт и химические модификации показаны в таблице 13. Клетки GM06214 трансфицировали разными dРНК с применением липофектамина RNAiMAX для редактирования внутриклеточных IDUA. Клетки собирали через 48 часов после трансфекции, и ферментативную активность IDUA определяли с применением способа, показанного в примере 23. Согласно результатам, показанным на фиг. 42А, все модификации привели к превосходной ферментативной активности, за исключением CM5 (5-я модификация: все нуклеотиды, кроме целевого нуклеотида и 5нт с каждой стороны от него, были модифицированы 2'-О-Me). Модификация целевого нуклеотида или двух ближайших к нему нуклеотидов не снижает эффективности редактирования.

[00302] Эффективность редактирования дополнительно определяли путем подсчета степени замещения А на G. Способ описан ниже. Последовательность, содержащая целевой аденозин в гене IDUA клеток GM06214, представляет собой CTAG, который мутирован в CTGG после редактирования РНК с применением dРНК. CTAG является сайтом распознавания рестрикционного фермента BfaI. Таким образом, успешное замещение А на G не приводит к перевариванию BfaI, в то время как у дикого типа это происходит. После редактирования, РНК клеток GM06214 выделяли и подвергали обратной транскрипции в кДНК. ПЦР проводили с применением кДНК. Праймеры hIDUA-62F: CCTTCCTGAGCTACCACCCG (SEQ ID NO: 415) и hIDUA-62R: CCAGGGCTCGAACTCGGTAG (SEQ ID NO: 416). После ПЦР продукт очищали и инкубировали с BfaI (NEB, кат. № R0568L). Степень замещения А на G или эффективность редактирования определяли с помощью электрофореза в агарозном геле. Результат выражали как процент неразрезанных срезов (с замещением А на G) от общего количества нуклеиновой кислоты в продукте ПЦР, рассчитанный с применением значений серого на изображении гель-электрофореза. Результат показан на фиг. 42В. Данные аналогичны результату анализа ферментативной активности на фиг. 42А.

Таблица 13

Наименование	Длина	Паттерн модификации	Последовательность
HIV2-76-CM1	55нт-с-20нт	CM1: Модификации в CM0 и всех U: с	Gm*Am*Cm*G-C-C-C-A-C-C-G-Um-G-Um-G-G-Um-Um-G-C-Um-G-Um-C-C-A-G-G-A-C-G-G-Um-C-C-C-G-G-C-C-Um-G-C-G-A-C-A-C-Um-

		помощью 2'-ОМе	Um-C-G-G-C-C-C-A-G-A-G-C-Um-G-C-Um-C-C-Um-C-A-Um-C-Um*Gm*Cm*Gm (SEQ ID NO: 361)
HIV2-76-CM2	55нт-с-20нт	CM2: Модификации в CM1 и нацеливающий триплет представляет собой CCAm	Gm*Am*Cm*G-C-C-C-A-C-C-G-Um-G-Um-G-G-Um-Um-G-C-Um-G-Um-C-C-A-G-G-A-C-G-G-Um-C-C-C-G-G-C-C-Um-G-C-G-A-C-A-C-Um-Um-C-G-G-C-C-C-Am-G-A-G-C-Um-G-C-Um-C-C-Um-C-A-Um-C-Um*Gm*Cm*Gm (SEQ ID NO: 361)
HIV2-76-CM3	55нт-с-20нт	CM3: Модификации в CM1 и нацеливающий триплет представляет собой CmCA	Gm*Am*Cm*G-C-C-C-A-C-C-G-Um-G-Um-G-G-Um-Um-G-C-Um-G-Um-C-C-A-G-G-A-C-G-G-Um-C-C-C-G-G-C-C-Um-G-C-G-A-C-A-C-Um-Um-C-G-G-C-Cm-C-A-G-A-G-C-Um-G-C-Um-C-C-Um-C-A-Um-C-Um*Gm*Cm*Gm (SEQ ID NO: 361)
HIV2-76-CM4	55нт-с-20нт	CM4: Модификации в CM1 и нацеливающий триплет представляет собой C*C*A*	Gm*Am*Cm*G-C-C-C-A-C-C-G-Um-G-Um-G-G-Um-Um-G-C-Um-G-Um-C-C-A-G-G-A-C-G-G-Um-C-C-C-G-G-C-C-Um-G-C-G-A-C-A-C-Um-Um-C-G-G-C-C*C*A*G-A-G-C-Um-G-C-Um-C-C-Um-C-A-Um-C-Um*Gm*Cm*Gm (SEQ ID NO: 361)
HIV2-76-CM5	55нт-с-20нт	CM5: Модификации в CM1 и всех нуклеотидах с помощью 2'-ОМе, кроме нацеливающего нуклеотида и 5нт от него с каждой стороны	Gm*Am*Cm*Gm-Cm-Cm-Cm-Am-Cm-Cm-Gm-Um-Gm-Um-Gm-Gm-Um-Um-Gm-Cm-Um-Gm-Um-Cm-Cm-Am-Gm-Gm-Am-Cm-Gm-Gm-Um-Cm-Cm-Cm-Gm-Gm-Cm-Cm-Um-Gm-Cm-Gm-Am-Cm-Am-Cm-Um-Um-C-G-G-C-C-C-A-G-A-G-C-Um-Gm-Cm-Um-Cm-Cm-Um-Cm-Am-Um-Cm-Um*Gm*Cm*Gm (SEQ ID NO: 361)
HIV2-76-	55нт-с-	CM6:	Gm*Am*Cm*Gm*Gm*Gm*C-C-A-C-C-G-U-G-U-G-

CM6	20нт	5 концевых оснований на каждом конце с помощью с 2'-ОМе, а первые и последние 5 межнуклеотидных связей были фосфоротиоатными	G-U-U-G-C-U-G-U-C-C-A-G-G-A-C-G-G-U-C-C-C-G-G-C-C-U-G-C-G-A-C-A-C-U-U-C-G-G-C-C-C-A-G-A-G-C-U-G-C-U-C-C-U-C-A-U*Cm*Um*Gm*Cm*Gm (SEQ ID NO: 361)
HIV2-71-CM1	55нт-с-15нт	CM1: Модификации в CM0 и всех U: с помощью 2'-ОМе	Gm*Am*Cm*G-C-C-C-A-C-C-G-Um-G-Um-G-G-Um-Um-G-C-Um-G-Um-C-C-A-G-G-A-C-G-G-Um-C-C-C-G-G-C-C-Um-G-C-G-A-C-A-C-Um-Um-C-G-G-C-C-C-A-G-A-G-C-Um-G-C-Um-C-C-Um*Cm*Am*Um (SEQ ID NO: 350)
HIV2-71-CM2	55нт-с-15нт	CM2: Модификации в CM1 и нацеливающий триплет представляет собой CCAm	Gm*Am*Cm*G-C-C-C-A-C-C-G-Um-G-Um-G-G-Um-Um-G-C-Um-G-Um-C-C-A-G-G-A-C-G-G-Um-C-C-C-G-G-C-C-Um-G-C-G-A-C-A-C-Um-Um-C-G-G-C-C-C-Am-G-A-G-C-Um-G-C-Um-C-C-Um*Cm*Am*Um (SEQ ID NO: 350)
HIV2-71-CM3	55нт-с-15нт	CM3: Модификации в CM1 и нацеливающий триплет представляет собой CmCA	Gm*Am*Cm*G-C-C-C-A-C-C-G-Um-G-Um-G-G-Um-Um-G-C-Um-G-Um-C-C-A-G-G-A-C-G-G-Um-C-C-C-G-G-C-C-Um-G-C-G-A-C-A-C-Um-Um-C-G-G-C-Cm-C-A-G-A-G-C-Um-G-C-Um-C-C-Um*Cm*Am*Um (SEQ ID NO: 350)
HIV2-71-CM4	55нт-с-15нт	CM4: Модификации в CM1 и нацеливающий триплет представляет	Gm*Am*Cm*G-C-C-C-A-C-C-G-Um-G-Um-G-G-Um-Um-G-C-Um-G-Um-C-C-A-G-G-A-C-G-G-Um-C-C-C-G-G-C-C-Um-G-C-G-A-C-A-C-Um-Um-C-G-G-C-C*C*A*G-A-G-C-Um-G-C-Um-C-C-Um*Cm*Am*Um (SEQ ID NO: 350)

		собой С*С*А*	
HIV2-71- CM5	55нт-с- 15нт	CM5: Модификации в CM1 и всех нуклеотидах с помощью 2'-ОМе, кроме нацеливающего нуклеотида и 5нт от него с каждой стороны	Gm*Am*Cm*Gm-Cm-Cm-Cm-Am-Cm-Cm-Gm- Um-Gm-Um-Gm-Gm-Um-Um-Gm-Cm-Um-Gm- Um-Cm-Cm-Am-Gm-Gm-Am-Cm-Gm-Gm-Um- Cm-Cm-Cm-Gm-Gm-Cm-Cm-Um-Gm-Cm-Gm- Am-Cm-Am-Cm-Um-Um-C-G-G-C-C-C-A-G-A- G-C-Um-Gm-Cm-Um-Cm-Cm-Um*Cm*Am*Um (SEQ ID NO: 350)
HIV2-71- CM6	55нт-с- 15нт	CM6: 5 концевых оснований на каждом конце с помощью с 2'- ОМе, а первые и последние 5 межнуклеотидны х связей были фосфоротиоатны ми	Gm*Am*Cm*Gm*Gm*С-С-А-С-С-Г-У-Г-У-Г- Г-У-У-Г-С-У-Г-У-С-С-А-Г-Г-А-С-Г-Г-У-С-С- С-Г-Г-С-С-У-Г-С-Г-А-С-А-С-У-У-С-Г-Г-С-С- С-А-Г-А-Г-С-У-Г-С-У-С*См*Um*См*Am*Um (SEQ ID NO: 350)

Примечание: "m" относится к 2'-О-Ме на рибозе нуклеотида, "*" относится к фосфороотиоатной связи.

Пример 29. Дальнейшая проверка паттерна модификации

[00303] Паттерн модификации CM1 протестировали на другой последовательности. Предпочтительный паттерн модификации в предшествующем уровне техники применяли в качестве контроля. Как показано в таблице 14, 55нт-с-15нт-CM1 была тестовой последовательностью, а 36нт-с-13нт-CM11 была положительным контролем, в котором все нуклеотиды, за исключением редактирующего триплета "CCA", модифицированы 2'-О-Ме, а также первая и последние 4 межнуклеотидные связи были фосфороотиоатными. Кроме того, длина 36нт-с-13нт-CM11 составляла только 51нт, что не является предпочтительной длиной в настоящем изобретении, но является предпочтительной длиной для предшествующего уровня техники. Через 48 часов после трансфекции dРНК в клетки

GM06214 с применением липофектамина RNAiMAX ферментативную активность IDUA определяли с применением способа, показанного в Примере 23. Как показано на фиг. 44, 55нт-с-15нт-СМ1 (55nt-c-15nt-CM1) имел значительно более высокую эффективность редактирования, чем 36нт-с-13нт-СМ11.

Таблица. 14

Название	Паттерн модификации	Последовательность
55нт-с- 15нт- СМ1	СМ1	Gm*Am*Cm*G-C-C-C-A-C-C-G-Um-G-Um-G- G-Um-Um-G-C-Um-G-Um-C-C-A-G-G-A-C-G- G-Um-C-C-C-G-G-C-C-Um-G-C-G-A-C-A-C- Um-Um-C-G-G-C-C-C-A-G-A-G-C-Um-G-C- Um-C-C-Um*Cm*Am*Um(SEQ ID NO: 366)
36нт-с- 13нт- СМ11	СМ11: Все нуклеотиды, за исключением нацеливающего триплета CroCroAro, модифицированы с помощью 2'-О-Ме, первые и последние 4 межнуклеотидные связи были фосфоротиоатными	Cm*Um*Gm*Um*Cm-Cm-Am-Gm-Gm-Am- Cm-Gm-Gm-Um-Cm-Cm-Cm-Gm-Gm-Cm-Cm- Um-Gm-Cm-Gm-Am-Cm-Am-Cm-Um-Um-Cm- Gm-Gm-Cm-C-C-A-Gm-Am-Gm-Cm-Um-Gm- Cm-Um*Cm*Cm*Um*Cm (SEQ ID NO: 414)

Примечание: "m" относится к 2'-О-Ме на рибозе нуклеотида. "*" Относится к фосфоротиоатной связи.

Пример 30. Дополнительное испытание dPHK в других клетках.

[00304] Данный пример сфокусирован на восстановлении мутации USH2A с.11864 G>A (p.Trp3955*) с применением технологии LEAPER. Репортерная система, сконструированная в этом примере, показана на фиг. 45А. В случае USH2A с.11864 G>A (p.Trp3955*, нормальная последовательность TGG была мутирована в TAG, который является стоп-кодоном. Таким образом, трансляция мутированной мРНК будет прервана рано на TAG. Репортерная система 293Т (293Т клетки из лаборатории С. Zhang, Пекинский университет) представляет собой лентивирусный вектор, а мРНК, показанная на фиг. 45А вверху, управляется промотором CMV. Система включает следующие части: 1) красный

флуоресцентный белок mCherry, который может быть стабильно экспрессирован, 2) сайт мутации гена USH2A и прилегающие 100 пар оснований с обеих сторон, 3) зеленый флуоресцентный белок GFP. Когда сайт мутации успешно отредактирован, кодон TAG преобразуется в TIG, что позволяет продолжить трансляцию, и GFP после последовательности USH2A может транслироваться нормально. Таким образом, выражение GFP представляет эффективность редактирования.

[00305] dPHK были синтезированы *in vitro*, и все последовательности dPHK, примененные в данном примере, показаны в таблице 15. Все последовательности dPHK были модифицированы по паттерну CM0. Конкретные стадии теста следующие:

[00306] Репортерные клетки 293Т культивируют в DMEM (Hyclone SH30243.01) с 10% FBS (Vistech, SE100-011). После слияния клетки переносят в 12-луночные планшеты по 15000 клеток/лунку. Время записывали как 0 часов.

[00307] Через 24 часа клетки 293Т в каждой лунке трансфицируют 12,5 пмоль dPHK с применением реагента липофектамина RNAiMAX (Invitrogen 13778150). Протокол трансфекции был представлен в руководстве по продукту.

[00308] Через 72 часа клетки в каждой лунке переваривают трипсином (Invitrogen, 13778-150) и определяют интенсивность FITC (флуоресцеина изотиоцианат) с помощью проточного цитометра.

[00309] Как показано на фиг. 45B, клетки были эффективны при редактировании dPHK с 3'- и 5'-концами одинаковой длины. NC представляет собой контрольные клетки без трансфекции dPHK. В соответствии с приведенными выше примерами, соотношение GFP-положительных клеток, трансфицированных dPHK из 111нт, 91нт и 71нт, превышало 90 %, в то время как клетки, трансфицированные dPHK из 51нт, приводили к очень низкому GFP-положительному соотношению. По данным MFI (средней интенсивности флуоресценции) слева dPHK из 111нт привела к самой высокой интенсивности флуоресценции.

[00310] Как показано на фиг. 45C, dPHK с 3'- и 5'-концами разной длины и dPHK из 111нт с 3'- и 5'-концами равной длины трансфицировали в клетки по отдельности. dPHK, применяемая в данном примере, с 5'-концом 55нт имеет 3'-конец 55нт, 45нт, 35нт, 25нт или 5нт. Точно так же dPHK с 3'-концом 55нт имеет 5'-конец 55нт, 45нт, 35нт, 25нт или 5нт. Согласно результату, представленному на фиг. 45C, эффективность редактирования резко снизилась, когда длина dPHK была уменьшена до 61нт, в то время как более длинные dPHK имели явно более высокую эффективность редактирования. Среди них dPHK 55нт-с-25нт (55нт-с-25нт) имела самую высокую эффективность редактирования. Таким образом, 3'-конец был зафиксирован на 25нт, а dPHK с 5'-концами разной длины от 55нт до 25нт. Результат клеток, трансфицированных этими dPHK, показан на фиг. 45D. Две 55нт-с-25нт

dPHK были из 2 разных партий. Было очевидно, что чем короче 5'-конец, тем ниже эффективность редактирования. Кроме того, результат на фиг. 45D снова указал, что для обеспечения эффективности редактирования длина dPHK предпочтительно не должна быть меньше 61нт.

Таблица 15.

Длина	Номер последовательности	Последовательность
55нт-С- 55нт	SEQ ID NO: 414	agcccaaggagcuggaaaaucuuagguggagcuuccagaguuuuguguuaaugacc acagacucuccacugaacccuuggaguuacaggcucugacccgauauucguagag
45нт-С- 45нт	SEQ ID NO: 415	gcuggaaaaucuuagguggagcuuccagaguuuuguguuaaugaccacagacucuc cacugaacccuuggaguuacaggcucugacccgau
35нт-С- 35нт	SEQ ID NO: 416	cuuagguggagcuuccagaguuuuguguuaaugaccacagacucuccacugaaccc uuggaguuacaggcu
25нт-С- 25нт	SEQ ID NO: 417	agcuuccagaguuuuguguuaaugaccacagacucuccacugaacccuugga
55нт-С- 45нт	SEQ ID NO: 418	agcccaaggagcuggaaaaucuuagguggagcuuccagaguuuuguguuaaugacc acagacucuccacugaacccuuggaguuacaggcucugacccgau
55нт-С- 35нт	SEQ ID NO: 419	agcccaaggagcuggaaaaucuuagguggagcuuccagaguuuuguguuaaugacc acagacucuccacugaacccuuggaguuacaggcu
55нт-С- 25нт	SEQ ID NO: 420	agcccaaggagcuggaaaaucuuagguggagcuuccagaguuuuguguuaaugacc acagacucuccacugaacccuugga
55нт-С- 15нт	SEQ ID NO: 421	agcccaaggagcuggaaaaucuuagguggagcuuccagaguuuuguguuaaugacc acagacucuccacug
55нт-С- 5нт	SEQ ID NO: 422	agcccaaggagcuggaaaaucuuagguggagcuuccagaguuuuguguuaaugacc acaga
45нт-С- 55нт	SEQ ID NO: 423	gcuggaaaaucuuagguggagcuuccagaguuuuguguuaaugaccacagacucuc cacugaacccuuggaguuacaggcucugacccgauauucguagag
35нт-С- 55нт	SEQ ID NO: 424	cuuagguggagcuuccagaguuuuguguuaaugaccacagacucuccacugaaccc uuggaguuacaggcucugacccgauauucguagag
25нт-С- 55нт	SEQ ID NO: 425	agcuuccagaguuuuguguuaaugaccacagacucuccacugaacccuuggaguuaca ggcucugacccgauauucguagag
15нт-С-	SEQ ID NO:	guuuguguuaaugaccacagacucuccacugaacccuuggaguuacaggcucugac

55 _{HT}	426	ccgauauucguagag
5 _{HT} -C- 55 _{HT}	SEQ ID NO: 427	augaccacagacucuccacugaacccuuggaguuacaggcucugacccgauauucgu agag
50 _{HT} -C- 25 _{HT}	SEQ ID NO: 428	aaggagcuggaaaaucuuagguggagcuuccagaguuuuguguuaaugaccacaga cucuccacugaacccuugga
45 _{HT} -C- 25 _{HT}	SEQ ID NO: 429	gcuggaaaaucuuagguggagcuuccagaguuuuguguuaaugaccacagacucuc cacugaacccuugga
40-C- 25 _{HT}	SEQ ID NO: 430	aaaaucuuagguggagcuuccagaguuuuguguuaaugaccacagacucuccacug aaccuugga
35 _{HT} -C- 25 _{HT}	SEQ ID NO: 431	cuagguggagcuuccagaguuuuguguuaaugaccacagacucuccacugaaccc uugga
30-C- 25 _{HT}	SEQ ID NO: 432	gguggagcuuccagaguuuuguguuaaugaccacagacucuccacugaacccuugga

[00311] κДНК ADAR1(p110)

5'-

atggccgagatcaaggagaaaatctgcgactatctcttcaatgtgtctgactcctctgccctgaatttggtctaaaaatattggccttaccaggc
ccgagatataaatgctgtgctaattgacatggaaaaggcagggggatgtctatagacaaggacacccctcccatatggcatttgacagac
aagaagcgagagagatgcaaatcaagagaaatacgaacagtgttctgaaaccgctccagctgcaatccctgagacaaaagaacgc
agagttctcactgtatataccacatcaaatgctcaataacatggtaccacagaaaaagtggagaatgggcaggaaacctgtcataa
agttagaaaacaggcaagaggccagaccagaaccagcaagactgaaccacctgttcattacaatggccctcaaaagcagggtatgtg
actttgaaaatggccagtggggccacagatgacatccagatgacttgaatgatatccgcgcagcaccagggtgagttcgagccatcatgga
gatgcccctcctctacagtcagtggttggccacggtgttccctacaagaaactgacagagtggcagctgaagaaccccatcagcgggctgt
tagaatatgccagttcgctagtcacacctgtgagttcaacatgatagagcagagtggaccacccatgaacctgatttaaattccaggtgt
catcaatggccgagagtttccccagctgaaagctggagcaagaaagtggccaagcaggatgcagctatgaaagccatgacaattctgt
agaggaaagccaaaagcagagcagtggaataatcagaagaatcatccactattccacagagaaagaatcagagaagactgcagagtcc
cagacccccacccctcagccacatccttcttcttgggaagagccccgtcaccacactgcttgagtgtatgcacaaattggggaaactcctgc
gaattccgtctcctgtccaaaagaaggccctgcccatgaaccaaagttccaatactgtgttgcaagtgggagcccaaaactttccccagtgtgagt
gtccccagcaagaaagtggcacaagcagatggccgcagagggaagccatgaaggccctgcagtgaggagcgcaccaactccatggcttctg
ataaccagcctgaaggatgatctcagagtcacttgataacttgaatccatgatgcccaacaaggtcagggaagattggcgagctcgtgaga
tacctgaacaccaacctgtgggtggccttttgagtagcccgctcccatggcttctgtgtgaattcaagttggtcgaccagtcgggacct
ctcagcagcccaagttcgtttaccaagcaaaagtgggggtcgtgtgttccagccgtctgcgcacacagcaagaagcaaggcaagca
gggaagcagcagatggcgctctccgtgtcttgattggggagaaacgagaaggcagaacgcagtggtttcacagaggtaacccagtgacag
ggggcagctcagaagaactatgtcctcctctcaaggtccccagaagcacagccaaagacactccctcactggcagcaccttccatga
ccagatagccatgtgagccaccgggtcttaacactctgactaacagcttccagccctccttgcctggccgcaagattctggccgccatca
ttatgaaaaaagactctgaggacatgggtgtcgtcgtcagcttgggaacaagggaatcgtgtgtgtaaaaggagattctctcagcctaaaaggga
gaaactgtcaatgactgccatgcagaaataatctccggagaggcttcatcaggtttctctacagtgaagtaataaactccagactg
cgaaggatagtatattgaacctgctaaggagagagaaaaagctccaataaaaaagactgtgtcattccatctgtatcagcactgtccgt
gtggagatggcgccctctttgacaagtctgcagcgaccgtgtatggaaagcacagaatcccgccactacctgtcttcgagaatcccaa
acaaggaaagctccgcaccaagggtggagaacggagaaggcacaatcctgtggaatccagtgacattgtgcctacgtgggatggcattc
ggctcggggagagactccgtaccatgtcctgtagtgaacaaatctacgctggaacgtgtggtggcctgcaaggggactgttgaccactt
cctgcagcccatattatctcaaatctgtcacattgggttacctttcagccaaaggcatctgacctgtctatttctgtcgtgtgacaagagatg
ggagtgcatttgaggatggactacgacatcccttattgtcaaccaccccaagggttggcagagtcagcatatatgattccaaaaggcaatccg
ggaagactaaggagacaagcgtcaactggtgtctggtgatggctatgacctggagatcctggacgggtaccagaggcactgtggatgggc
cacgggaatgaattgtccgggtctccaaaagaacattttcttatttaagaagctctgtccttccgttaccgcagggtactgagactct
cctatggtgaggccaagaaagctggcgtgactacgagacggccaagaactacttcaaaaaaggcctgaaggatatgggctatgggaact
ggattagcaaacccagaggagaaaagaactttatctctgccagta gattacaaggatgacgacgataag(Flag mapkep) TAG-
3' (SEQ ID NO:332)

κДНК ADAR1(p150)

5'atgaatccgcggcaggggtattccctcagcggatactacacccatccattcaaggctatgagcacagacagctcagataccagcagcct
gggccaggatcttccccagtagtttctgcttaagcaaatagaatttctcaaggggcagctcccagaagcaccgggtgattggaaagcaga
caccgtcactgccaccttccctcccaggaactccggccaagggttcagtagtacttgcctccagtaggagcaggcaggcaagtgacatcag
gggtgtccccaggggctgtcatctcggaaagtcagggggtccagagaggggttcagcatcttaccacgtggcaggaggtgtgccacaga
gaggtgtgattgctttctcacttccaggaactgagtagtaccagatcaggaaacaaaggatcttaaaagtcttggaaagagcttgggga
agggaaggccaccacagcacatgactgtctgggaaacttgggactccgaagaaagaaatcaatcaggtttatactccttggcaaaagag
ggcaagctacagaaagaggcagggaacaccccccttgggaaaatcgcggctcactcagggttggaaaccagcacagcggagtggttaag
accagacgggtcatagccaaggagccccaaactcagacccgagtttggaaaccggaagacagaaactccacatctgtctcagaagatcttctt
gagcctttattgcagttcagctcagggttggaaaccagcacagcggagtggttaagaccagacagtcatagccaaaggatccccaaactcag
accaggttggaaactgaagacagcaactccacatctgccttggaaagatcttctttagtttttagacatggccgagatcaaggagaaatct
gcgactatcttcaatgtgtctgactccttgcctgaatttggctaaaaatattggccttaccaggccgagatataaatgtgtgtaattg
acatggaaagggcagggggatgtctatagacaagggacaacccctcccatatggcatttgacagacaagaagcgagagaggatgcaaatc
aagagaataacgaacagtggtcctgaaaccgtccagctgcaatccctgagaccaaaagaaacgcagagttcctcacctgtaatatacca
catcaaatgcctcaataacatggttaaccacagaaaaagtggagaatgggcagggaacctgtcataaagttagaaacaggcaagaggcca
gaccagaaccagcaagactgaaaccacctgttcattacaatggccctcaaaaaggaggtatgttgaacttgaataatggccagtgggccac
agatgacatcccagatgacttgaatagtagcgcgcagcaccaggtgagtttcagccatcatggagatgccctccttctacagtcaggtt
ggccaggtgttcacccacagaagaaactgacagagtgccagctgaagaacccatcagcgggctgttagaatatgccagttcgtagtcaa
acctgtgagttcaacatgatatagcagagtgaggaccacccatgaacctcgaattaaattccaggtgtcatcaatggccgagagtttccccca
gctgaagctggaagcaagaaagtggccaagcagagtgacgtatgaaagccatgacaattctgtagaggaagccaaagccaagggaca
gtggaaaatcagaagaatcatccactattccacagagaaaagaatcagagaagactgcagagttccagacccccaccccttcagccacat
ccttctttctgggaaagagccccgtcaccacactgcttgaagtgtatgcacaaattggggaactcctgcgaattccgtctcctgtcacaagaaagg
ccctgccccatgaacccaagttccaactgtgttgcagtgaggagcccaacttccccagtgtagtgctccagcaagaaagtggcaaaag
cagatggccgcagagggaagccatgaaggccctgcatggggagggcgaccaactccatggcttctgataaccagcctgaaggtagatctca
gagtcacttgataacttgaatccatgatgcccaacaaggtcaggaagattggcgagctcgtgagatacctgaacaccaacctgtgggtg
gccttttggagtacgccgctccatggcttctgtctgaattcaagtgtgcgaccagtcgggacctcctcacgagcccaagttcgtttacca
agcaaaagtgggggtcgtgtgttccagccgtctgcgcacacagcaagaagcaaggaagcaggaagcagcagatgcggctctccgt
gtcttgattggggagaacgagaaggcagaacgcagtggttccagaggttaacccagtgacagggggcagctcagaagaactatgctc
ctctctcaagggtccccagaagcacagccaaagacactcctctcactggcagcacccttccatgaccagatagccatgctgagccaccgggt
gttcaacactctgactaacagttccagccctccttgcctggccgcaagattctggccgccatcattatgaaaaaagactctgaggacatgg
gtgtcgtcgtcagcttgggaacagggaatcgtgtgtaaaaggagattctctcagcctaaaaaggagaaactgtcaatgactgccatgcagaa
ataatctccggagagggttcatcaggttctctacagtgagttaatgaaatacaactccagactgcgaaggatagtataattgaacctgttaa
gggagggagaaaaagctccaaataaaaaagactgtgtcattccatctgtatacagcactgctccgtgtggagatggcgccctcttggacaagtc
ctgcagcgaccgtgctatggaaagcacagaatcccgccactacctgtcttcgagaatccaaacaaggaaagctccgcaccaaggtgga
gaacggagaaggcacaatccctgtggaatccagtgcattgtgcctacgtgggatggcattcggctcggggagagactccgtaccatgtc
ctgtagtacaaaatcctacgtggaacgtgctgggctgcaaggggcactgttgaccacttccctgcagcccatttatctcaaatctgtcac
attgggttacctttcagccaagggtcagctgacctgtctattgtctgtgtgacaagagatgggagtgcaattgaggatggactacgacat
ccctttattgtcaaccaccccaaggttggcagagtcagcatatattgttcaaaaaggcaatccgggaagactaaggagacaagcgtcaact
gggtgtctggctgatggctatgacctggagatcctggacgggtaccagaggcactgtggatggggccacggaatgaattgtccgggtctcaa
aaagaacattttcttctatttaagaagctctgctcctccgttaccgcagggtactgagactccttatggtgagggccaagaaagctgcc
gtgactacgagacggccaagaactacttcaaaaaaggcctgaaggatgggctatgggaactggattagcaaacccaggaaggaaaag
aactttatctctgccagta gattacaaggatgacgacgataag(Flag mapke) TAG-3' (SEQ ID NO:333)

κДHK ADAR2

5'-

atggatatagaagatgaagaaaacatgagttccagcagcactgatgtgaaggaaaaccgcaatctggacaacgtgtccccaaggatggc
agcacacctgggcctggcgaggggtctcagctctcaatgggggtgggtgtggccccggcagaaagcgggccctggaggagggcagc
aatggccactccaagtaccgcctgaagaaaaggaggaaaacaccagggccccgtcctcccaagaacgccttgatgcagctgaatgagat

caagcctggtttgagctacacactcctgtcccagactgggcccgtgcacgcgcctttgttgcctgtctgtggaggtgaatggccaggtttt
gagggctctggtcccacaaagaaaaaggcaaaactccatgctgctgagaaggccttgaggtctttcgttcagttcctaatacctctgagggc
cacctggccatggggaggaccctgtctgtcaacacggacttcacatctgaccaggccgacttcctgacacgctcttcaatggtttgaaact
cctgacaaggcggagcctccctttacgtgggctccaatggggatgactccttcagttccagcggggacctcagcttctgtctccccgt
gcctgccagcctagcccagcctcctctccctgccttaccaccattcccacccccagtggggaagaatcccgtgatgatcttgaacgaactgc
gcccaggactcaagtatgacttctctccgagagcggggagagccatgccaaagagcttctcatgtctgtgtgctggtgaggtcagttcttg
aaggctcggggagaaacaagaagcttgccaaggccgggctgcgcagcttgcctggccgccatttttaacttgcaattggatcagacgc
catctcgccagcctattcccagtgagggcttcagctgcattaccgcaggttttagctgacgctgtctcacgcctggctcgtggtaagttggt
gacctgaccgacaacttctcctccctcacgctcgcagaaaagtgtggctggagtcgtcatgacaacaggcacagatgttaaagatgcca
aggtgataagtggttctacaggaacaaaatgtattaatggtgaatacatgagtgtatcgtggccttgcaataatgactgcatgcagaaataata
tctcggagatccttgctcagatttctttatacacaacttgagctttacttaataacaaagatgatcaaaaaagatccatcttcagaaatcagagc
gaggggggtttaggctgaaggagaatgtccagttcatctgtacatcagcacctctccctgtggagatgccagaatcttctcaccacatgagc
caatcctggaagaaccagcagatagacacccaaatcgtaaagcaagaggacagctacggacaaaatagagtctggtgaggggacgatt
ccagtgcgctccaatgcgagcatccaaacgtgggacgggggtgtgcaaggggagcggctgtcaccatgtcctgcagtgacaagattgc
acgctggaacgtggtgggcatccagggatccctgtcagcattttcgtggagccatttacttctcgagcatcatcctgggcagcctttacca
cggggaccacctttccagggccatgtaccagcggatctccaacatagaggacctgccacctctctacacctcaacaagcctttgctcagt
gcatcagcaatgcagaagcacggcagccagggaaggccccaacttcagtgtaactggacggtaggcgactccgctattgaggtcatc
aacgccacgactgggaaggatgagctgggcccgcgctcccgcctgtgtaagcacgcgttgactgtcgtggtgagtgacggcaa
gggtccctcccacttactacgctccaagattaccaaacccaacgtgtacatgagtccaagctggcggcaaaggagtaccaggccgcaa
ggcgcgtctgttcacagcctcatcaaggcggggctgggggcctgggtggagaagcccaccgagcaggaccagttctcactcacgcc
gattacaaggatgacgacgataag (flag маркер) tag-3' (SEQ ID NO: 334)

Кодирующая последовательность (CDS) генов, связанных с заболеванием

COL3A1

5'-

atgatgagctttgtgcaaaaggggagctggctacttctcgctctgcttcatccactattattttggcacaacaggaagctgtgaaggaggat
gttcccatcttggtcagtcctatgcggatagagatgtctggaagccagaacctgccaaatgtgtctgtgactcaggatccgttctctcga
tgacataatatgtacgatcaagaattagactgccccaacccagaaattccatttgagaatgttgagctttgccacagcctccaactgct
cctactcgccctcctaattggtcaaggacctcaaggcccaaggagatccaggccctcctggtattcctgggagaaatggtgacctggtg
ttccaggacaaccagggtcccctggttctcctggccccctggaatctgtgaatcatgccctactggtcctcagaactattctcccagtatga
ttcatatgatgtcaagtctggagtagcagtaggaggactcgcaggctatcctggaccagctggccccccaggccctcccggtccccctggt
acatctggctcatcctggttcccctggatctccaggataccaaggacccccctggtgaacctgggcaagctggctcctcaggccctccaggacc
tctggtgctataggtccatctggtcctgctggaaaagatggagaatcaggtagaccggacgacctggagagcgaggattgcctggacct
ccagggtatcaaagggtccagctgggatacctggattccctggtatgaaaggacacagaggcttcgatggacgaaatggagaaaagggtgaa
acagggtgctcctggattaaagggtgaaaatggtcttcaggcgaaaatggagctcctggacccatgggtccaagaggggctcctggtgag

cgaggacggccaggacttctggggctgcaggtgctcggggaatgacgggtgctcgaggcagtgatggtcaaccaggccctcctggtcc
tcttgaactgccggattccctggatcccctggtgctaagggtgaagttggacctgcagggctcctggttcaaatggtgccctggacaaa
gaggagaacctggacctcaggacacgctggtgctcaaggctccttggccctcctgggattaatggtagtcctggtggtaaaggcgaaat
gggtcccgtggcattcctggagctcctggactgatgggagccccgggtctccaggaccagccggtgctaattggtgctcctggactgcg
aggtggtgcaggtgagcctggtgaagaatggtgccaaaggagagcccgaccacgtggtgaacgcggtgaggctggtattccaggtgttc
caggagctaaaggcgaagatggcaaggatggatcacctggagaacctggtgcaaattgggttccaggagctgcaggagaaaggggtg
cccctgggttccaggacctgctggaccaaattggcatcccaggagaaaaagggctcctgctggagagcgtggtgctccaggccctgcagg
gcccagaggagctgctggagaacctggcagagatggcgctccctggaggtccagggaatgaggggcatgcccggaaagtcaggaggacc
aggaagtgatgggaaaccaggccctcccggaagtcaaggagaaagtggctgaccaggtcctcctgggccatctggtccccgaggtcag
cctggtgtcatgggcttccccggctcctaaaggaaatgatggtgctcctggtgaagaatggagaacaggtggccctggaggacctggccct
cagggtcctcctggaaagaatggtgaaactggacctcagggacccccaggccctactgggcctggtggtgacaaaggagacacaggac
cccctggtccacaaggattacaaggcttgcctggtacaggtggtcctccaggagaaaatggaaaacctggggaaccaggtccaaaggggt
gatccggtgcacctggagctccaggaggcaagggtgatgctggtgcccctggtgaacgtggacctcctggattggcaggggccccag
gacttagaggtggagctggtccccctggtcccgaaggaggaaaggggtgctgctggtcctcctgggccacctggtgctgctggtactcctg
gtctgcaaggaaatgctggagaaagaggaggtcttggagtcctggtccaaaggggtgacaaggggaaccaggcggtccaggtgctgat
ggtgtcccagggaagatggccaaggggtcctactggtcctattggtcctcctggcccagctggccagcctggagataaggggtgaaggt
ggtgcccccgacttccaggtatagctggacctcgtggtagccctggtgagagaggtgaaactggccctccaggacctgctggtttccctg
gtgctcctggacagaatggtgaacctggtggttaaaggagaaagaggggtcgggtgagaaaggtgaaggaggccctcctggagttgc
aggacccccctggaggttctggacctgctggtcctcctggtcccaaggtgtcaaaggtgaacgtggcagtcctggtggacctggtgctgct
ggcttccctggtgctcgtggtcttctggtcctcctggtagtaatggtaccaggacccccaggtcccagcggttctccaggcaaggatgg
gccccaggtcctgcgggtaacctggtgctcctggcagccctggagtgtctggacaaaaggtgatgctggccaaccaggagagaagg
gatcgctggtgcccaggggcccaccaggagctccaggcccacttgggattgctgggatcactggagcacgggggtcttgaggaccacca
ggcatgccaggtcctaggggaagccctggccctcagggtgtcaagggtgaaagtgggaaaccaggagctaacgggtctcagtggaagac
gtggtccccctggaccccagggtcttctggtctggtggtacagctggtgaacctggaagagatggaaccctggatcagatggtcttcc
aggccgagatggatctcctggtggcaagggtgatcgtggtgaaaatggctcctcctggtgcccctggcgctcctggtcatccaggcccact
ggtcctgtcggtccagctggaaagagtgggtgacagaggagaaagtggccctgctggccctgctggtgctcccggctcctgctggttcccga
ggtgctcctggtcctcaaggcccacgtggtgacaaaggtgaaacaggtgaacgtggagctgctggcatcaaaggacatcgaggattccct
ggtaatccaggtgccccaggttctccaggccctgctggtcagcagggtgcaatcggcagtcaggacctgcaggccccagaggacctgtt
ggaccagtggtacctcctggcaagatggaaccagtggtgacatccaggtccattggaccaccaggccctcaggtgaacagaggtgaaa
gaggatctgagggtccccaggccaccagggaaccaggccctcctggacctcctggtgcccctggtccttctgctggtggtgttgag
ccgctgccattgctgggattggaggtgaaaaagctggcggttttccccgtattatggagatgaaccaatggatttcaaatcaacaccgatg
agattatgacttcaactcaagtctgttaattggacaaatagaaagcctcattagtcctgatggttctcgtaaaaaccccgctagaaactgcagaga
cctgaaattctgccatctgaactcaagagtggagaatactgggttgaccctaaccaaggatgcaaattggatgctatcaaggtattctgtaat
atggaaactggggaacatgcataagtccaatcctttgaatgttccacggaaacactggtggacagattctagtgtgagaagaaacacgt
ttggtttggagagtcctggatggtggttttcagtttagctacggcaatcctgaacttctgaagatgtccttgatgtgcagctggcattcctcg

acttctctccagccgagcttccagaacatcacatatcactgcaaaaatagcattgcatacatggatcaggccagtggaaatgtaagaagg
ccctgaagctgatggggtaaataaaggtgaattcaaggctgaaggaaatagcaaatccctacacagttctggaggatggtgcacgaa
acacactggggaatggagcaaacagctcttgaatatcgaaacacgaaggctgtgagactacattgtagatattgcaccctatgacattgg
tggctctgatcaagaatttgggtgtggacgttggccctgttgcctttataa-3' (SEQ ID NO: 335)

BMPR2

5'-

atgacttcctcgctgcagcggccctggcgggtgccctggctaccatggaccatcctgctggcagcgtcgggctgcttcgcagaatcaag
aacggctatgtgcgtttaaagatccgtatcagcaagaccttgggataggtgagagtagaatctctcatgaaaatgggacaatattatgctcga
aaggtagcacctgctatggccttgggagaaatcaaaaggggacataaatctgtaaaacaaggatgttggctcacattggagatcccaa
gagtgtcactatgaagaatgtgtagtaactaccactcctccctcaattcagaatggaacataccgtttctgctgtgtagcacagatttatgaat
gtcaactttactgagaattttccactcctgacacaacaccactcagtcacctcattcatttaaccgagatgagacaataatcattgcttggca
tcagtctctgtattagctgtttgatagttgccttatgcttggatacagaatgttgacaggagaccgtaacaaggcttcacagtatgaacatg
atggaggcagcagcatccgaacctctcttgatctagataatctgaaactgttggagctgattggccgaggctgatatggagcagtatataaa
ggctccttggatgagcgtccagttgctgtaaaagtgtttccttgcacacgtcagaattttatcaacgaaaagaacattacagagtgccttgg
atggaacatgacaacattgcccgtttatagttggagatgagagagtcactgcagatggacgcatggaatatttgcctgtgatggagtactatc
ccaatggatctttatgcaagtatttaagtctccacacaagtgactgggtaagctcttgcctgtctcattctgttactagaggactggcttatct
tcacacagaattaccacgaggagatcattataaacctgcaatttccatcgagatttaaacagcagaaatgtcctagtgaaaaatgatggaac
ctgtgttattagtacttggactgtccatgaggctgactggaaatagactggtgcgccaggggaggaagataatgcagccataagcgag
gttggcactatcagatatatggcaccagaagtgttagaaggagctgtgaacttgagggactgtgaatcagcttgaacaagtagacatgtat
gctcttggactaatctattgggagatatttatgagatgtacagaccttcccaggggaatccgtaccagagtaccagatggcttttcagacag
aggttggaaaccatcccactttttaggatatgcagggtctcgtgtctagggaaaaacagagaccaagtcccagaagcctggaaagaaaat
agcctggcagtgaggtcactcaaggagacaatcgaagactgttgggaccaggatgcagaggctcggcttactgcacagtgtgctgagga
aaggatggctgaacttatgatgattgggaaagaaacaaatctgtgagcccaacagtcaatccaatgtctactgctatgcagaatgaacgcaa
cctgtcacataataggcgtgtgccaaaaattggctccttatccagattattcttctctcatacattgaagactctatccatcatactgacagcatc
gtgaagaatatttctctgagcattctatgtccagcacacctttagctataggggaaaaaacgaaattcaattaactatgaacgacagcaag
cacaagctcgaatcccagccctgaaacaagtgtcaccagcctctccaccaacacaacaaccacaacaccacaggactcacgccaagt
actggcatgactactatatctgagatgccataccagatgaaacaaatctgcataccacaaatgttgacagtcattgggccaaccctgtct
gcttacagctgacagaagaagacttgaaaccaacaagctagacccaaaagaagttgataagaacctcaaggaaagctctgatgagaatc
tcatggagcactctttaaacagttcagtggtggccagaccactgagcagtagttagcttgccttaccactcataaaacttgtagtagaa
gcaactggacagcaggacttcacacagactgcaaatggccaagcatgtttagctctgatgttctgcctactcagatctatcctctcccaagc
agcagaaccttcccagagacctactagtttgccttgaacacaaaaattcaacaaaagagccccggctaaaatttggcagcaagcaca
atcaaaactgaaacaagtgcgaactggagttgccaagatgaatacaatcaatgcagcagaacctcatgtgtgacagtcacatgaatggtg
tggcaggtagaacacagtgtaactcccatgctgccacaaccaatataccaatgggacagtactatctggccaaacaaccaacatagt
gacacatagggcccaagaaatgtgcagaatcagtttattgggtgaggacacccggctgaatattaattccagtcctgatgagcatgagcctt

actgagacgagagcaacaagctggccatgatgaaggtgttctggatcgtcttggacaggagggaacggccactagaaggtggccgaa
ctaattccaataacaacaacagcaatccatgttcagaacaagatgttctgcacagggtgtccaagcacagcagcagatcctgggccatca
aagcccagaagagcacagaggcctaattctctggatcttcagccacaaatgtcctggatggcagcagtatacagataggtgagtcaaac
aagatggcaaatcaggatcagggtgaaaagatcaagaaacgtgtgaaaactccctattctttaagcgggtggcgccctccacctgggtcatc
tccactgaatcgctggactgtgaagtcaacaataatggcagtaacagggcagttcattccaaatccagcactgctgtttaccttgcaagga
ggcactgctacaacatgggtgtctaaagatataggaatgaactgtctgtga-3' (SEQ ID NO: 336)

AHI1

5'-

atgcctacagctgagagtgaagcaaaagtaaaaccaaagttcgcttgaagaattgcttaagaccacagtgatctaatgcgtgaaaagaa
aaaactgaagaaaaaactgtcaggtctgaagaaaacatctcacctgacactattagaagcaatcttactatatgaaagaaactacaagtga
tgatcccgacactattagaagcaatcttccccatattaaagaaactacaagtgatgatgaagtgtgctaactaacaacctgaagaagag
cacgagagtcactaaaaacaattgaggaacacacagttagcaactgaaaatcctaattggtgatgctagtgtagaggaagacaaaacagg
aaagccaaataaaaagggtgataaagacgggtgccccagttgactacacaagacctgaaaccggaaaactcctgagaataagggtgattctaca
caccagaaaacacatacaaagccacagccaggcgttgatcatcagaaaagtgagaaggcaaatgagggagagaagagactgatttaga
agaggatgaagaattgatgcaagcatatcagtgccatgtaactgaagaaatggcaaaggagattaagaggaaaataagaagaaactgaa
agaacagttgacttacttccctcagatactttattccatgatgacaaactaagcagtgaaaaaaggaaaaagaaaagggaagttccagcttc
tctaaagctgaacaagtacattgaccatctctggtgacacagttgaagggtgaacaaaagaaagaatcttcagttagatcagtttctcagattc
tcatcaagatgatgaaataagctcaatggaacaaagcacagaagacagcatgcaagatgatacaaaacctaaacaaaaaaacaaaaaa
gaagactaaagcagttgcagataataatgaagatgttgatggtgatggtgttcataaataacaagccgagatagcccggttatcccaatg
tttgcttgatgatgacctgtcttgggagtttacattcaccgaactgatagacttaagtcagattttatgatttctacccaatggtaaaatcatgt
ggttgatgagcactatggtcaatatgtcaagaaagatgatagtgacggcctgtttcatcttactatgaaaagagaatgtggattatattcttc
tattatgaccagccatatgattttaacagttaaaatcaagacttccagagtgggaagaacaaattgtatttaagaaaatttccctatttgcttc
gaggctctgatgagagtcctaaagtcacctgttctttgagattcttgatttcttaagcgtggatgaaattaagaataattctgaggttcaaacca
agaatgtggctttcgaaaattgcctgggcatttcttaagcttctgggagccaatggaaatgcaaacatcaactcaaaacttcgcttgacgcta
tattaccacctaactaagcctcgatccccattaagtgtgttgaggcatttgaatggtggtcaaaatgtccaagaaatcattacctatcaacact
gtacgtaactgtaagaggactgaaagttccagactgtataaagccatcttaccgctctatgatggctcttcaggaggaaaaaggtaaacaggt
gcattgtgaacgtcacatgagtcagctcagtagacacagaacctggattagaagagtc aaagggaagtaataaagtggaaacgactccct
gggcaggcttgccgtatcccaacaaacacctcttctactaaatgcaggagaacgaggatgttttcttgatttctccacaatggaagaa
tattagcagcagcttgtgccagccgggatggatatccaattatttatgaaattccttctggacgtttcatgagagaattgtgtggccacctca
atatcatttatgatcttctggtcaaaagatgatcactacatccttacttcatcatctgatggcactgccaggatatggaaaaatgaaataaca
atacaataactttcagagttttacctcatccttctttgtttacacggctaaattccatccagctgtaagagagctagtagttacaggatgctatgat
tccatgatacggatatggaaagttgagatgagagaagattctgccatattggtccgacagtttgacgttcacaaaagtttatcaactcactttgt
tttgatactgaaggctcatcatatgtattcaggagattgtacaggggtgattgttgttgaatacctatgtcaagattaatgatttggaaacattcagt
gcaccactggactataaataaggaaattaaagaaactgagtttaagggaattccaataagttatttgagattcatccaatggaaaacggttgt

taatccataccaaagacagtactttgagaattatggatctccgatattagtagcaaggaagttttaggagcagcaaattatcgggagaaga
ttcatagtactttgactccatgtgggacttttctgttgcggaagtgaggatggtatagtgtatgtttggaaccagaaacaggagaacaagta
gccatgtattctgacttgccattcaagtcacccattcgagacatttctatcatccatttgaaaatatggttgcaattctgtgcatttgggcaaatga
gccaattcttctgtatatttacgatttccatgttcccagcaggaggctgaaatgttcaaacgctacaatggaacatttccattacctggaataca
ccaaagtcaagatgccctatgtacctgtccaaaactaccccatcaaggctcttttcagattgatgaatttgtccacactgaaagttctcaacga
agatgcagctagtaaaacagaggcttgaaactgtcacagaggatgatacgttctgtgctgcaaaagtcaacaaaaatctctcattacttcacc
accagcagtttctcacaacagtctaagttaagcagtcaaacatgctgaccgctcaagagattctacatcagtttggtttactcagaccggg
attatcagcatagaaagaaagccttgaacctcaggtagatacagcaccaacggtagtggctctttatgactacacagcgaatcgatcagat
gaactaacatccatcgcgagacattatccgagtgttttcaaagataatgaagactgggtggtatggcagcataggaaaggacaggaag
gttattttccagctaatacatgtggctagtgaacactgtatcaagaactgcctcctgagataaaggagcgatccctccttaagccctgagga
aaaaactaaaatagaaaaatctccagctcctcaaaagcaatcaataagaacaagtcccaggacttcagactaggctcagaatctatga
cacattctgaaatgagaaaagaacagagccatgaggaccaaggacacataatggatacacggatgaggaagaacaagcaagcaggcag
aaaagtcactctaatagagta-3' (SEQ ID NO: 337)

FANCC

5'-

atggctcaagattcagtagatcttctgtgattatcagtttggatgcagaagcttctgtatgggatcaggcttccacttggaaaccagcaa
gacacctgtcttcacgtggctcagttccaggagttcctaaggaagatgtatgaagccttgaaagagatggattctaatacagtcattgaaagat
tccccacaattggtaactgttggcaaaagcttgttgaatcctttatttttagcatatgatgaaagccaaaaaattctaataatggtgcttatgtt
ctaattaacaaagaaccacagaattctggacaatcaaaacttaactcctggatacagggtgtattatctatatacttccagcactcagatttga
aaagaagttgctcttttactcaaggtcttgggtatgcacctatagattactatcctggtttgccttaaaaatattggtttatcattagcgtctgaact
agagagaatcatcttaattgatttaacactcaaaggcgaatggctcccagcgcagtggtgctccctgtcacgagtttgtgtcccacttattacc
tgacagatgttgacccctgggtggaggctctcctcatctgtcatggacgtgaacctcaggaaatcctccagccagagttctttgaggctgtaa
acgaggccattttgtgaagaagatttctctcccatgtcagctgtagtctgcctctggcttcggcaccttcccagccttgaaaaagcaatgct
gcatctttttgaaaagctaatactccagtgaagaaattgtctgagaaggatcgaatgctttataaaagattcatcgctgcctcaagcagcctgcc
accctgccatattccgggttgtgatgagatgttcaggtgtgcactcctggaaaccgatggggccctggaaatcatagccactattcaggtgtt
tacgcagtgtttgtagaagctctggagaaagcaagcaagcagctgcggttgcactcaagacactatttcttacacttctccatctttgcc
tggtgctgctgcaagacctcaagatatccctcggggacactggctccagacactgaagcatatttctgaactgctcagagaagcagttgaa
gaccagactcatgggtcctgcggaggtccctttagagctgggtcctgttcattcacttcggaggatgggctgagatgggtggcagagcaatt
actgatgtcggcagccgaacccccacggccctgctgtggctcttggccttctactacggccccctgatgggaggcagcagagagcaca
gactatggtccaggtgaaggccgtgctgggccacctcctggcaatgtccagaagcagcagcctctcagcccaggacctgcagacggtag
caggacagggcacagacacagacctcagagctcctgcacaacagctgatcaggcaccttctcctcaacttctgctctgggctcctggagg
ccacacgatgcctgggatgtcatcacctgatggctcacactgctgagataactcacgagatcattggctttcttgaccagacctgtacag
atggaatcgtcttggcattgaaagccctagatcagaaaaactggcccagagctccttaagagctgcgaactcaagtctag-3' (SEQ
ID NO: 338)

MYBPC3

5'-

atgcctgagccggggaagaagccagctctcagcttttagcaagaagccacgggtcagtggaagtggccgcaggcagccctgccgtgttcca
ggccgagacagagcgggcaggagtgaaaggtgcgctggcagcgcggaggcagtgacatcagcgccagcaacaagtacggcctggcca
cagagggcacacggcatagcgtgacagtgcggaagtgggccctgccgaccagggatcttacgcagtcattgttggtcctccaaggtc
aagttcgacctcaaggtcatagaggcagagaaggcagagcccatgctggcccctgcccctgcccctgctgaggccactggagcccctgg
agaagccccggccccagccgctgagctgggagaaagtggcccaagtcctcaaaagggtaagctcagcagctctcaatggctcctaccctg
gagccccgatgacccattggcctcttcgtgatgcggccacaggatggcgaggtgacctgggtggcagcatcaccttcagccccgcg
tggccggcgccagcctcctgaagccgctgtggtcaagtgggtcaagggaatgggtggacctgagcagcaaggtgggcccagcacct
gcagctgcacgacagctacgaccgcgcagcaaggtctatctgttcgagctgcacatcacgatgccagcctgccttcactggcagctac
cgctgtgaggtgtccaccaaggacaaatttgactgtctcaacttcaatctcactgtccacgaggccatgggcaccggagacctggacctcct
atcagccttcgcccgcagcagcctggctggaggtggctcgccgatcagtgatagccatgaggacactgggattctggacttcagctcactg
ctgaaaaagagagacagtttccggaccccaggggactcgaagctggaggccaccagcagaggaggacgtgtgggagatcctacggcag
gcacccccatctgagtacgagcgcacatgccttcagctacggcgtcactgacctgcgcggcatgctaaagaggctcaagggcagtgaggcg
cgatgagaagaagagcacagccttcagaagaagctggagccggcctaccaggtgagcaaaaggccacaagatccggctgacctggaa
ctggctgacctgacgctgaggtcaaatggctcaagaatggccaggagatccagatgagcggcagcaagtacatctttgagtcctcggtg
ccaagcgtacctgacctcagccagtgctcattggcggacgacgcagcctaccagtgctggtgggtggcgagaagtgtacacggag
ctctttgtgaaagagccccctgtgctcatcacgcgcccttgaggaccagctggtgatgggtggggcagcgggtggagtttgagtgtaag
tatcgaggaggggggcgcaagtcaaatggctgaaggacgggggtggagctgacccgggaggagaccttcaataccgggtcaagaagg
acgggcagagacaccacctgatcatcaacgaggccatgctggaggacgcggggcactatgactgtgcactagcgggggcccaggcgct
ggctgagctcattgtgcaggaaaagaagctggaggtgtaccagagcatgcagacctgatgggtgggcgcaaaggaccaggcggtgttca
aatgtgaggtctcagatgagaatgttcggggtgtgtggctgaagaatgggaaggagctggtgcccagacgccgataaaggtgtccaca
tcgggcgggtccaaaactgaccattgacgacgtcacacctgccgacgaggctgactacagctttgtcccaggggcttcgctgcaacct
gtcagccaagctccacttcattggaggtcaagattgacttcgtaccaggcaggaacctcccaagatccacctggactgccagggccgata
ccagacaccattgtggtgtagctggaaataagctacgtctggacgtccctatctctggggaccctgctcccactgtgatctggcagaaggct
atcacgcaggggaataaaggccccagccaggccagccccagatgccccagaggacacaggtgacagcgatgagtggtgtttgacaag
aagctgctgtgtgagaccgagggccgggtccgctggagaccaccaaggaccgcagcatcttcacggtcgagggggcagagaaggaa
gatgaggcgctctacaggtcacagtgaagaacctgtgggcgaggaccaggtcaacctcacagtcaaggtcatcgacgtgccagacgc
acctgcggcccccaagatcagcaacgtgggagaggactcctgcacagtacagtgggagccgctgcctacgatggcgggcagcccatc
ctgggctacatcctggagcgcaagaagaagaagagctaccgggtgatgcggctgaacttcgacctgattcaggagctgagtcataagcg
cggcgcatgatcagggcggtgtgtacgagatgcgcgtctacgcggtcaacgccatcggtcatgacggcccagccctgcctcccagcc
cttcacgtatgcctatcggtccccccagcgaaccacccacctggcagtagaggacgtctctgacaccacggctcctcctcaagtggcgcccc
agagcgcgtgggagcaggaggcctggatggctacagcgtggagtactgcccagagggtgctcagagtgggtggctgcctgcaggg
gctgacagagcacacatcgatactggtgaaggacctgcccacggggggccggctgctttccagagtgcgggcacacaatatggcagggc

ctggagcccctgttaccaccacggagccggtgacagtgcaggagatcctgcaacggccacggcttcagctgccagggcacctgcgcca
gaccattcagaagaaggtcggggagcctgtgaaccttctcatcccttccagggcaagccccggcctcaggtgacctggaccaaagagg
gcagcccctggcaggcgaggaggtgagcatccgcaacagccccacagacaccatcctgttcatccgggcccgtcgccgctgcattcag
gcacttaccaggtgacggtgcgcatgagaacatggaggacaaggccacgctggtgctgcaggtgttgacaagccaagtctccccagg
atctccgggtgactgacgcctggggctttaatgtggctctggagtggaaagccacccaggtgctggcaacacggagctctgggggtaca
cagtgcagaaagccgacaagaagaccatggagtgggtcaccgtcttgagcattaccgccgcacccactgcgtggtgccagagctcatca
ttggcaatggctactactccgctcttcagccagaatatggttggctttagtgacagagcggccaccaccaaggagcccgtctttatcccca
gaccaggcatcacctatgagccacccaactataagggcctggacttctccgaggccccaagcttcaccagccccctggtgaaccgctcgg
tcatcgccgggtacactgctatgctctgctgtgctgtccgggtagccccaagcccaagatttctggttcaagaatggcctggacctggga
gaagacgcccgttccgcatgttcagcaagcaggaggtgtgactctggagattagaaagccctgccccttgacgggggcatctatgtctg
cagggccaccaacttacaggcgaggcacggtgtgagtccgcctggaggtgcgagtgccctcagtga-3' (SEQ ID NO: 339)

IL2RG

5'-

atgttgaagccatcattaccattcacatccctcttattcctgcagctgcccctgctgggagtggggctgaacacgacaattctgacgccaatg
ggaatgaagacaccacagctgatttcttctgaccactatgccactgactccctcagtggttccactctgcccctcccagagggtcagtggtt
gtgttcaatgtcgagtacatgaattgcacttggaaacagcagctctgagccccagcctaccaacctcactctgcattattggtacaagaactcg
gataatgataaagtcagaagtgcagccactatctattctgaagaaatcacttctggctgtcagttgcaaaaaaggagatccacctctacc
aaacatttgttgttcagctccaggacccacgggaacccaggagacaggccacacagatgctaaaactgcagaatctggtgatcccctggg
ctccagagaacctaacttcacaaactgagtgaatcccagctagaactgaactggaacaacagattctgaaccactgtttggagcacttgg
tgcagtaccggactgactgggaccacagctggactgaacaatcagtggttattatagacataagttctccttgccctagtgtggatgggcagaaa
cgctacacgtttcgtgttcggagccgctttaaccactctgtggaagtgtcagcattggagtgaatggagccaccaatccactgggggag
caatacttcaaaagagaatcccttctgttgcattggaagccgtggttatctctgttggctccatgggattgattatcagccttctctgtgtgtattt
ctggctggaacggacgatgccccgaattcccacctgaagaacctagaggatcttgttactgaataccacgggaacttttcggcctggagt
gtgtgttaaggagctggctgagagtctgcagccagactacagtgaacgactctgcctcgtcagtgagattccccaaaaggaggggcccct
tggggaggggcccctggggcctcccatgcaaccagcatagcccctactggggccccccatgttacaccctaagcctgaaacctga-3'
(SEQ ID NO: 340)

Обсуждение

[00312] Технологии редактирования генома революционизируют биомедицинские исследования. Высокоактивные нуклеазы, такие как нуклеазы цинковых пальцев (ZFNs)¹, эффекторные нуклеазы, подобные активаторам транскрипции (TALEN)²⁻⁴, и белки Cas системы CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats - короткие палиндромные повторы, регулярно расположенные группами)⁵⁻⁷ были успешно сконструированы для управления геномом у множества организмов. В последнее время

дезаминазы применяют для точного изменения генетического кода без нарушения двухцепочечной ДНК. Соединив цитидин или аденозиндезаминазу с системой CRISPR-Cas9, исследователи создали программируемые редакторы оснований, которые позволяют преобразовывать С•G в Т•А или А•Т в G•C в геномной ДНК⁸⁻¹⁰, предлагая новые возможности для коррекции мутаций, вызывающих заболевание.

[00313] Помимо ДНК, РНК является привлекательной мишенью для генетической коррекции, поскольку модификация РНК может изменить функцию белка без каких-либо постоянных изменений в геноме. Аденозиндезаминазы ADAR в настоящее время применяются для точного редактирования оснований РНК. У млекопитающих были идентифицированы три вида белков ADAR: ADAR1 (изоформы p110 и p150), ADAR2 и ADAR3 (каталитически неактивные)^{11,12}, субстраты которых представляют собой двухцепочечные РНК, где аденозин (A), ошибочно спаренный с цитозином (C), предпочтительно дезаминирован до инозина (I). Считается, что инозин имитирует гуанозин (G) во время трансляции^{13,14}. Для достижения целевого редактирования РНК белок ADAR или его каталитический домен были слиты с пептидом λ N¹⁵⁻¹⁷, SNAP-tag¹⁸⁻²² или белком Cas (dCas13b)²³, и была разработана направляющая РНК для рекрутирования химерного белка ADAR для конкретного сайта. В качестве альтернативы также сообщалось, что избыточная экспрессия белков ADAR1 или ADAR2 вместе с направляющей РНК, несущей мотив R/G, делает возможным целевое редактирование РНК²⁴⁻²⁷.

[00314] Все описанные способы редактирования нуклеиновых кислот в системе млекопитающих основаны на эктопической экспрессии двух компонентов: фермента и направляющей РНК. Хотя эти бинарные системы эффективно работают в большинстве исследований, некоторые врожденные препятствия ограничивают их широкое применение, особенно в терапии. Поскольку наиболее эффективная доставка *in vivo* для генной терапии осуществляется с помощью вирусных векторов²⁸, а крайне необходимые векторы аденоассоциированного вируса (AAV) ограничены размером карго-молекулы (приблизительно 4,5 т.п.н.), что затрудняет размещение как белка, так и направляющей РНК^{29,30}. Недавно сообщалось, что избыточная экспрессия ADAR1 придает онкогенность множественным миеломам из-за аберрантного гиперредактирования РНК³¹ и генерирует существенные глобальные нецелевые редактирования³². Кроме того, эктопическая экспрессия белков или их доменов, не происходящих от человека, имеет потенциальный риск проявления иммуногенности^{30,33}. Более того, ранее существовавший адаптивный иммунитет и ответ на повреждение ДНК, опосредованный p53, могут поставить под угрозу эффективность терапевтического белка, такого как Cas9³⁴⁻³⁸. Хотя пытались применять эндогенный механизм для редактирования РНК, это было сделано только путем инъекции

предварительно собранного транскрипта-мишени: дуплекса РНК в эмбрионы *Xenopus*³⁹. Необходимы альтернативные технологии для надежного редактирования нуклеиновых кислот, которые не зависят от эктопической экспрессии белков. В настоящем документе авторами изобретения разработан новый подход, в котором применяют эндогенный ADAR для редактирования РНК. Показано, что экспрессия специально разработанной направляющей РНК обеспечивает эффективное и точное редактирование эндогенных РНК и исправляет патогенные мутации. Эта платформа для редактирования одинарных нуклеиновых кислот может открыть новые возможности для лечения и исследований.

[00315] В частности, авторами изобретения показано, что экспрессия линейной агРНК подходящей длины способна направлять эндогенные белки ADAR на редактирование аденозина до инозина на транскриптах-мишенях. Эта система, называемая LEAPER, применяет эндогенные белки ADAR для достижения программируемого редактирования нуклеиновых кислот, тем самым обладая преимуществами по сравнению с существующими подходами.

[00316] Редким качеством LEAPER является его простота, поскольку он полагается только на небольшой размер молекулы РНК, чтобы направлять эндогенные белки для редактирования РНК. Это напоминает РНКи, где малая дцРНК может задействовать нативный механизм для нацеленной деградации РНК⁵¹. Из-за небольшого размера агРНК может быть легко доставлена множеством вирусных и невирусных носителей. В отличие от РНКи, LEAPER катализирует точное переключение А в I, не вызывая разрезания или деградации транскриптов-мишеней (фиг. 18А). Хотя потребность в длине агРНК больше, чем у РНКи, она не вызывает иммуностимулирующих эффектов на клеточном уровне (фиг. 22Е, f и фиг. 29Е) и не влияет на функцию эндогенных белков ADAR (фиг. 22А, b), делая стратегию безопасной для нацеливания РНК. Примечательно, что сообщалось, что эктопическая экспрессия белков ADAR или их каталитических доменов индуцирует существенные глобальные нецелевые редактирования³² и, возможно, запускает рак³¹.

[00317] Недавно несколько групп сообщили, что редактор основания цитозин может генерировать существенные нецелевые однонуклеотидные варианты в эмбрионах мыши, рисовых или человеческих клеточных линиях из-за экспрессии эффекторного белка, что демонстрирует преимущество LEAPER для потенциального терапевтического применения⁵²⁻⁵⁴. К счастью, LEAPER обеспечивает эффективное редактирование, в то же время вызывая редкое глобальное нецелевое редактирование (фиг. 20 и фиг. 21). Кроме того, LEAPER может минимизировать потенциальную иммуногенность или преодолеть препятствия для доставки, обычно характерные для других способов, требующих введения чужеродных белков.

[00318] Для LEAPER рекомендовано применять агРНК с минимальным размером более 70 нуклеотидов для достижения желаемой активности. В естественном окружении белки ADAR неспецифически редактируют повторы Alu, которые имеют дуплекс из более чем 300 нуклеотидов⁵⁵. Следует отметить, что повторы Alu образуют стабильный внутримолекулярный дуплекс, в то время как LEAPER действует в межмолекулярном дуплексе между агРНК и мРНК или пре-мРНК, которая, как предполагается, менее стабильна и труднее формируется. Таким образом, авторами изобретения сделано предположение, что дуплекс РНК длиной более 70 нуклеотидов является стехиометрически важным для рекрутирования или стыковки белков ADAR для эффективного редактирования. Действительно, более длинная агРНК приводила к более высокому результату редактирования как в эктопически экспрессируемых репортерах, так и в эндогенных транскриптах (фиг. 16D и фиг. 17B). Однако, поскольку белки ADAR беспорядочно дезаминируют аденозиновое основание в дуплексе РНК, более длинная агРНК может привести к большему количеству нецелевых в пределах окна нацеливания.

[00319] Хотя LEAPER мог эффективно воздействовать на нативные транскрипты, их эффективность редактирования и частота отклонений от цели варьировались. Для нацеливания на транскрипт PPIB можно преобразовать 50 % целевого аденозина в инозин без очевидных отклонений от цели в окнах покрытия (фиг. 17B, F). Для других транскриптов отклонения от цели стали более серьезными. Авторам изобретения удалось уменьшить нецелевые события, такие как введение ошибки спаривания A-G или последовательных ошибок спаривания для подавления нежелательного редактирования. Однако слишком большое количество ошибок спаривания может снизить эффективность попадания в цель. При оценке эффективности и потенциальных отклонений от цели, рекомендуемая длина агРНК составляет от 100 до 150 нуклеотидов для редактирования эндогенных транскриптов. Если есть выбор, лучше выбирать области с меньшим количеством аденозина, чтобы свести к минимуму вероятность нежелательных редактирований. Обнадеживает то, что авторы изобретения не обнаружили каких-либо нецелевых действий вне дуплексов агРНК-транскрипт-мишень (фиг. 20).

[00320] Авторы изобретения оптимизировали конструкцию агРНК для достижения улучшенной эффективности редактирования и продемонстрировали, что LEAPER можно применять для управления функцией гена или исправления патогенной мутации. Также показано, что LEAPER не ограничивается только работой с UAG, вместо этого он работает, возможно, с любым аденозином, независимо от его фланкирующих нуклеотидов (фиг. 16F, g и фиг. 17C). Такая гибкость полезна для потенциальной терапевтической коррекции генетических заболеваний, вызванных определенными точечными мутациями. Интересно

отметить, что при редактировании транскриптов IDUA агРНК, нацеленная на пре-мРНК, более эффективна, чем нацеленная на зрелую РНК, что указывает на то, что ядра являются основными сайтами действия для белков ADAR, и LEAPER можно применять для управления сплайсингом путем модификации сайтов сплайсинга в пре-мРНК. Более того, LEAPER продемонстрировал высокую эффективность одновременного нацеливания на несколько транскриптов генов (фиг. 17D). Эта мультиплексирующая способность LEAPER может быть развита для лечения определенных полигенетических заболеваний в будущем.

[00321] Предпочтительно проводить генетическую коррекцию на уровне РНК. Во-первых, редактирование целевых транскриптов не приведет к постоянному изменению репертуара генома или транскриптома, делая подходы к редактированию РНК более безопасными для терапии, чем средства редактирования генома. Кроме того, временное редактирование хорошо подходит для временного контроля за лечением заболеваний, вызванных случайными изменениями в конкретном состоянии. Во-вторых, LEAPER и другие способы редактирования РНК не вносят двуцепочечные разрывы (DSB) в геном, избегая риск возникновения нежелательных делеций больших фрагментов ДНК³⁷. Способами редактирования оснований ДНК с применением нуклеаз Cas9 можно по-прежнему генерировать инсерционно-делеционные мутации в геноме⁸. Кроме того, независимо от механизма репарации нативной ДНК, LEAPER также должен работать в постмитозных клетках, таких как клетки мозжечка с высокой экспрессией ADAR2¹¹.

[00322] Авторы изобретения продемонстрировали, что LEAPER можно применять к широкому спектру типов клеток, таких как клеточные линии человека (фиг. 14C), клеточные линии мыши (фиг. 14D) и первичные клетки человека, включая первичные Т-клетки (фиг. 27 и фиг. 28D). Эффективное редактирование посредством доставки лентивирусов или синтезированного олигонуклеотида обеспечивает повышенный потенциал для терапевтического развития (фиг. 28). Более того, LEAPER может вызывать фенотипические или физиологические изменения в различных областях применения, включая восстановление транскрипционной регуляторной активности p53 (фиг. 7), исправление патогенных мутаций (фиг. 26) и восстановление активности α -L-идуронидазы в первичных фибробластах от пациентов с синдромом Гурлера (фиг. 29). Таким образом, можно предположить, что LEAPER обладает огромным потенциалом в лечении болезней.

[00323] Stafforst и соавт. сообщили о новом и, казалось бы, похожем способе редактирования РНК, названном RESTORE, который работает путем рекрутирования эндогенных ADAR с применением синтетических антисмысловых олигонуклеотидов⁵⁶. Фундаментальное различие между RESTORE и LEAPER заключается в особой природе направляющей РНК для рекрутирования эндогенного ADAR. Направляющая РНК

RESTORE ограничена хемосинтетическими антисмысловыми олигонуклеотидами (ASO) в зависимости от сложной химической модификации, в то время как агРНК LEAPER может генерироваться различными способами, химическим синтезом и экспрессией из вирусных или невирусных векторов (фиг. 28 и фиг. 29). Важно отметить, что, будучи сильно химически модифицированными, ASO ограничены временным действием при лечении заболеваний. Напротив, агРНК может быть получена посредством экспрессии, что особенно важно для постоянного редактирования.

[00324] Есть еще возможности для улучшений в отношении эффективности и специфичности LEAPER. Поскольку LEAPER полагается на эндогенный ADAR, уровень экспрессии белков ADAR в клетках-мишенях является одним из определяющих факторов успешного редактирования. Согласно ранее полученным данным⁵⁷ и наблюдениям авторов изобретения (фиг. 14A, b), ADAR1^{p110} повсеместно экспрессируется в тканях, что обеспечивает широкую применимость LEAPER. ADAR1^{p150} представляет собой интерферон-индуцируемую изоформу⁵⁸, и он доказал свою функциональность при LEAPER (фиг. 11E, фиг. 12B). Таким образом, котрансфекция РНК, стимулирующих интерферон, с агРНК может дополнительно повысить эффективность редактирования при определенных обстоятельствах. Альтернативно, поскольку ADAR3 играет ингибирующую роль, ингибирование ADAR3 может повышать эффективность редактирования в клетках, экспрессирующих ADAR3. Более того, дополнительная модификация агРНК может повысить эффективность ее редактирования. Например, агРНК, слитая с определенным каркасом, рекрутирующим ADAR, может увеличивать локальную концентрацию белка ADAR и, следовательно, повышать эффективность редактирования. До сих пор можно было применять только эндогенные белки ADAR1/2 для преобразования оснований А в I. Интересно исследовать, можно ли аналогичным образом применять более естественные механизмы для модификации генетических элементов, особенно для осуществления мощного редактирования нуклеиновых кислот.

[00325] В целом, авторами изобретения было обеспечено доказательство принципа того, что эндогенный аппарат в клетках может быть привлечен для редактирования транскриптов РНК. Продемонстрировано, что LEAPER представляет собой простую, эффективную и безопасную систему, проливающую свет на новый путь в области лечения и исследований, основанных на редактировании генов.

Список литературы

1. Porteus, M. H. & Carroll, D. Gene targeting using zinc finger nucleases. *Nat Biotechnol* 23, 967-973 (2005).

2. Boch, J. et al. Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors. *Science* 326, 1509-1512 (2009).
3. Moscou, M. J. & Bogdanove, A. J. A simple cipher governs DNA recognition by TAL effectors. *Science* 326, 1501 (2009).
4. Miller, J. C. et al. A TALE nuclease architecture for efficient genome editing. *Nat Biotechnol* 29, 143-148 (2011).
5. Jinek, M. et al. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* 337, 816-821 (2012).
6. Cong, L. et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science* 339, 819-823 (2013).
7. Mali, P. et al. RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science* 339, 823-826 (2013).
8. Komor, A. C., Kim, Y. B., Packer, M. S., Zuris, J. A. & Liu, D. R. Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage. *Nature* 533, 420-424 (2016).
9. Ma, Y. et al. Targeted AID-mediated mutagenesis (TAM) enables efficient genomic diversification in mammalian cells. *Nat Methods* 13, 1029-1035 (2016).
10. Gaudelli, N. M. et al. Programmable base editing of A*T to G*C in genomic DNA without DNA cleavage. *Nature* 551, 464-471 (2017).
11. Tan, M. H. et al. Dynamic landscape and regulation of RNA editing in mammals. *Nature* 550, 249-254 (2017).
12. Nishikura, K. Functions and regulation of RNA editing by ADAR deaminases. *Annu Rev Biochem* 79, 321-349 (2010).
13. Bass, B. L. & Weintraub, H. An unwinding activity that covalently modifies its double-stranded RNA substrate. *Cell* 55, 1089-1098 (1988).
14. Wong, S. K., Sato, S. & Lazinski, D. W. Substrate recognition by ADAR1 and ADAR2. *RNA* 7, 846-858 (2001).
15. Montiel-Gonzalez, M. F., Vallecillo-Viejo, I., Yudowski, G. A. & Rosenthal, J. J. Correction of mutations within the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator by site-directed RNA editing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, 18285-18290 (2013).
16. Sinnamon, J. R. et al. Site-directed RNA repair of endogenous Mecp2 RNA in neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 114, E9395-E9402 (2017).
17. Montiel-Gonzalez, M. F., Vallecillo-Viejo, I. C. & Rosenthal, J. J. An efficient system for selectively altering genetic information within mRNAs. *Nucleic Acids Res* 44, e157 (2016).

- 18 Hanswillemenke, A., Kuzdere, T., Vogel, P., Jekely, G. & Stafforst, T. Site-Directed RNA Editing in Vivo Can Be Triggered by the Light-Driven Assembly of an Artificial Riboprotein. *J Am Chem Soc* 137, 15875-15881 (2015).
- 19 Schneider, M. F., Wettengel, J., Hoffmann, P. C. & Stafforst, T. Optimal guideRNAs for re-directing deaminase activity of hADAR1 and hADAR2 in trans. *Nucleic Acids Res* 42, e87 (2014).
- 20 Vogel, P., Hanswillemenke, A. & Stafforst, T. Switching Protein Localization by Site-Directed RNA Editing under Control of Light. *ACS synthetic biology* 6, 1642-1649 (2017).
- 21 Vogel, P., Schneider, M. F., Wettengel, J. & Stafforst, T. Improving site-directed RNA editing in vitro and in cell culture by chemical modification of the guideRNA. *Angewandte Chemie* 53, 6267-6271 (2014).
- 22 Vogel, P. et al. Efficient and precise editing of endogenous transcripts with SNAP-tagged ADARs. *Nat Methods* 15, 535-538 (2018).
- 23 Cox, D. B. T. et al. RNA editing with CRISPR-Cas13. *Science* 358, 1019-1027 (2017).
- 24 Fukuda, M. et al. Construction of a guide-RNA for site-directed RNA mutagenesis utilising intracellular A-to-I RNA editing. *Scientific reports* 7, 41478 (2017).
- 25 Wettengel, J., Reautschnig, P., Geisler, S., Kahle, P. J. & Stafforst, T. Harnessing human ADAR2 for RNA repair - Recoding a PINK1 mutation rescues mitophagy. *Nucleic Acids Res* 45, 2797-2808 (2017).
- 26 Heep, M., Mach, P., Reautschnig, P., Wettengel, J. & Stafforst, T. Applying Human ADAR1p110 and ADAR1p150 for Site-Directed RNA Editing-G/C Substitution Stabilizes GuideRNAs against Editing. *Genes (Basel)* 8 (2017).
- 27 Katrekar, D. et al. In vivo RNA editing of point mutations via RNA-guided adenosine deaminases. *Nat Methods* 16, 239-242 (2019).
- 28 Yin, H., Kauffman, K. J. & Anderson, D. G. Delivery technologies for genome editing. *Nat Rev Drug Discov* 16, 387-399 (2017).
- 29 Platt, R. J. et al. CRISPR-Cas9 knockin mice for genome editing and cancer modeling. *Cell* 159, 440-455 (2014).
- 30 Chew, W. L. et al. A multifunctional AAV-CRISPR-Cas9 and its host response. *Nat Methods* 13, 868-874 (2016).
- 31 Teoh, P. J. et al. Aberrant hyperediting of the myeloma transcriptome by ADAR1 confers oncogenicity and is a marker of poor prognosis. *Blood* 132, 1304-1317 (2018).
- 32 Vallecillo-Viejo, I. C., Liscovitch-Brauer, N., Montiel-Gonzalez, M. F., Eisenberg, E. & Rosenthal, J. J. C. Abundant off-target edits from site-directed RNA editing can be reduced

by nuclear localization of the editing enzyme. *RNA biology* 15, 104-114 (2018).

33 Mays, L. E. & Wilson, J. M. The complex and evolving story of T cell activation to AAV vector-encoded transgene products. *Mol Ther* 19, 16-27 (2011).

34 Wagner, D. L. et al. High prevalence of *Streptococcus pyogenes* Cas9-reactive T cells within the adult human population. *Nat Med* 25, 242-248 (2019).

35 Simhadri, V. L. et al. Prevalence of Pre-existing Antibodies to CRISPR-Associated Nuclease Cas9 in the USA Population. *Mol Ther Methods Clin Dev* 10, 105-112 (2018).

36 Charlesworth, C. T. et al. Identification of preexisting adaptive immunity to Cas9 proteins in humans. *Nat Med* 25, 249-254 (2019).

37 Haapaniemi, E., Botla, S., Persson, J., Schmierer, B. & Taipale, J. CRISPR-Cas9 genome editing induces a p53-mediated DNA damage response. *Nat Med* 24, 927-930 (2018).

38 Ihry, R. J. et al. p53 inhibits CRISPR-Cas9 engineering in human pluripotent stem cells. *Nat Med* 24, 939-946 (2018).

39 Woolf, T. M., Chase, J. M. & Stinchcomb, D. T. Toward the therapeutic editing of mutated RNA sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 8298-8302 (1995).

40 Zheng, Y., Lorenzo, C. & Beal, P. A. DNA editing in DNA/RNA hybrids by adenosine deaminases that act on RNA. *Nucleic Acids Res* 45, 3369-3377 (2017).

41 Abudayyeh, O. O. et al. C2c2 is a single-component programmable RNA-guided RNA-targeting CRISPR effector. *Science* 353, aaf5573 (2016).

42 Daniel, C., Widmark, A., Rigardt, D. & Ohman, M. Editing inducer elements increases A-to-I editing efficiency in the mammalian transcriptome. *Genome Biol* 18, 195 (2017).

43 Chen, C. X. et al. A third member of the RNA-specific adenosine deaminase gene family, ADAR3, contains both single- and double-stranded RNA binding domains. *RNA* 6, 755-767 (2000).

44 Savva, Y. A., Rieder, L. E. & Reenan, R. A. The ADAR protein family. *Genome Biol* 13, 252 (2012).

45 Nishikura, K. A-to-I editing of coding and non-coding RNAs by ADARs. *Nat Rev Mol Cell Biol* 17, 83-96 (2016).

46 Floquet, C., Deforges, J., Rousset, J. P. & Bidou, L. Rescue of non-sense mutated p53 tumor suppressor gene by aminoglycosides. *Nucleic Acids Res* 39, 3350-3362 (2011).

47 Kern, S. E. et al. Identification of p53 as a sequence-specific DNA-binding protein. *Science* 252, 1708-1711 (1991).

48 Doubrovin, M. et al. Imaging transcriptional regulation of p53-dependent genes with positron emission tomography in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 9300-9305 (2001).

49 Landrum, M. J. et al. ClinVar: public archive of interpretations of clinically relevant

variants. *Nucleic Acids Res* 44, D862-868 (2016).

50 Ou, L. et al. ZFN-Mediated In Vivo Genome Editing Corrects Murine Hurler Syndrome. *Mol Ther* 27, 178-187 (2019).

51 Fire, A. et al. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391, 806-811 (1998).

52 Zuo, E. et al. Cytosine base editor generates substantial off-target single-nucleotide variants in mouse embryos. *Science* (2019).

53 Jin, S. et al. Cytosine, but not adenine, base editors induce genome-wide off-target mutations in rice. *Science* (2019).

54 Kim, D., Kim, D. E., Lee, G., Cho, S. I. & Kim, J. S. Genome-wide target specificity of CRISPR RNA-guided adenine base editors. *Nat Biotechnol* 37, 430-435 (2019).

55 Levanon, E. Y. et al. Systematic identification of abundant A-to-I editing sites in the human transcriptome. *Nat Biotechnol* 22, 1001-1005 (2004).

56 Merkle, T. et al. Precise RNA editing by recruiting endogenous ADARs with antisense oligonucleotides. *Nat Biotechnol* 37, 133-138 (2019).

57 Wagner, R. W. et al. Double-stranded RNA unwinding and modifying activity is detected ubiquitously in primary tissues and cell lines. *Mol Cell Biol* 10, 5586-5590 (1990).

58 Patterson, J. B. & Samuel, C. E. Expression and regulation by interferon of a double-stranded-RNA-specific adenosine deaminase from human cells: evidence for two forms of the deaminase. *Mol Cell Biol* 15, 5376-5388 (1995).

59 Gibson, D. G. et al. Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. *Nat Methods* 6, 343-345 (2009).

60 Zhou, Y., Zhang, H. & Wei, W. Simultaneous generation of multi-gene knockouts in human cells. *FEBS Lett* 590, 4343-4353 (2016).

61 Dobin, A. et al. STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics* 29, 15-21 (2013).

62 Van der Auwera, G. A. et al. From FastQ data to high confidence variant calls: the Genome Analysis Toolkit best practices pipeline. *Curr Protoc Bioinformatics* 43, 11 10 11-33 (2013).

63 Wang, K., Li, M. & Hakonarson, H. ANNOVAR: functional annotation of genetic variants from high-throughput sequencing data. *Nucleic Acids Res* 38, e164 (2010).

64. Genomes Project, C. et al. An integrated map of genetic variation from 1,092 human genomes. *Nature* 491, 56-65 (2012).

65. Pertea, M., Kim, D., Pertea, G. M., Leek, J. T. & Salzberg, S. L. Transcript-level expression analysis of RNA-seq experiments with HISAT, StringTie and Ballgown. *Nat Protoc*

11, 1650-1667 (2016).

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. РНК (рибонуклеиновая кислота), рекрутирующая дезаминазу (dРНК), имеющая длину от 60 до 200 нуклеотидов, где:

а) dРНК содержит комплементарную последовательность РНК, способную гибридизоваться с целевой РНК,

б) dРНК способна рекрутировать дезаминазу или конструкцию, содержащую дезаминазу, или конструкцию, содержащую каталитический домен дезаминазы, для дезаминирования целевого аденозина в целевой РНК, и

с) dРНК содержит одну или более химических модификаций.

2. dРНК по п. 1, имеющая длину более примерно 60 нуклеотидов (нт), 65 нт, 70 нт, 80 нт, 90 нт, 100 нт или 110 нт.

3. dРНК по п. 1 или п. 2, содержащая одну или более ошибку спаривания, неоднозначность и/или выпетливание с комплементарной областью целевой РНК.

4. dРНК по любому из пп. 1-3, где комплементарная последовательность РНК содержит цитидин, аденозин или уридин, прямо противоположный целевому аденозину в целевой РНК.

5. dРНК по п. 4, где цитидин, аденозин или уридин, прямо противоположный целевому аденозину, расположен по меньшей мере примерно на 7 нуклеотидов от 3'-конца, например, по меньшей мере примерно на 8, 9 или 10 нуклеотидов от 3'-конца.

6. dРНК по п. 4 или п. 5, где цитидин, аденозин или уридин, прямо противоположный целевому аденозину, расположен по меньшей мере примерно на 25 нуклеотидов от 5'-конца, например, по меньшей мере примерно на 30, 35, 40, 45, 50 или 55 нуклеотидов от 5'-конца.

7. dРНК по любому из пп. 4-6, где длины 5'- и 3'-последовательностей, фланкирующих цитидин, аденозин или уридин, прямо противоположный целевому аденозину, не равны.

8. dРНК по любому из пп. 4-7, где длина 5'-последовательности, фланкирующей цитидин, аденозин или уридин, прямо противоположный целевому аденозину, больше, чем длина 3'-последовательности.

9. dРНК по любому из пп. 1-8, содержащая цитидин, прямо противоположный целевому аденозину в целевой РНК.

10. dРНК по любому из пп. 1-9, где комплементарная последовательность РНК содержит один или более гуанозинов, каждый из которых противоположен нецелевому аденозину в целевой РНК.

11. dРНК по любому из пп. 1-10, где комплементарная последовательность содержит два или более последовательных ошибочно спаренных нуклеотида, противоположных нецелевому аденозину в целевой РНК.

12. dРНК по любому из пп. 1-11, где 5' ближайший сосед целевого аденозина в целевой РНК представляет собой нуклеотид, выбранный из U, C, A и G, предпочтительно $U > C \approx A > G$, и 3' ближайший сосед целевого аденозина в целевой РНК представляет собой нуклеотид, выбранный из G, C, A и U, предпочтительно $G > C > A \approx U$.

13. dРНК по любому из пп. 1-12, где целевой аденозин находится в мотиве из трех оснований, выбранном из группы, состоящей из UAG, UAC, UAA, UAU, CAG, CAC, CAA, CAU, AAG, AAC, AAA, AAU, GAG, GAC, GAA и GAU, в целевой РНК.

14. dРНК по п. 13, где мотив из трех оснований представляет собой UAG, и где dРНК содержит A, прямо противоположный уридину в мотиве из трех оснований, цитидин, прямо противоположный целевому аденозину, и цитидин, гуанозин или уридин, прямо противоположный гуанозину в мотиве из трех оснований.

15. dРНК по п. 14, содержащая 5'-ССА-3', прямо противоположный мотиву из трех оснований UAG.

16. dРНК по любому из пп. 1-15, где химическая модификация включает метилирование и/или фосфоротиоат.

17. dРНК по п. 16, где химическая модификация включает 2'-О-метилирование и/или межнуклеотидную фосфоротиоатную связь.

18. dРНК по п. 16, где химическая модификация включает 2'-О-метилирование в первых и последних от 1 до 5, от 2 до 5, от 3 до 5, от 4 до 5 нуклеотидах и/или фосфоротиоат в первых и последних от 1 до 5, от 2 до 5, от 3 до 5, от 4 до 5 межнуклеотидных связях.

19. dРНК по любому из пп. 16-18, где химическая модификация включает 2'-О-метилирование и/или 3'-фосфоротиоат в нуклеотиде, противоположном целевому аденозину, и/или его 5' и/или 3' ближайших нуклеотидах.

20. dРНК по любому из пп. 1-19, где химическая модификация выбрана из группы, состоящей из:

1) 2'-О-метилирования в первых и последних 3 нуклеотидах и/или фосфоротиоата в первых и последних 3 межнуклеотидных связях,

2) 2'-О-метилирования в первых и последних 3 нуклеотидах и/или фосфоротиоата в первых и последних 3 межнуклеотидных связях и 2'-О-метилирования в одном, или более, или всех уридинах,

3) 2'-О-метилирования в первых и последних 3 нуклеотидах, фосфоротиоата в первых и последних 3 межнуклеотидных связях, 2'-О-метилирования в одном, или более,

или всех уридинах и модификации нуклеотида, противоположного целевому аденозину, и/или его 5' и/или 3' ближайших нуклеотидах,

4) 2'-О-метиличования в первых и последних 3 нуклеотидах, фосфоротиоата в первых и последних 3 межнуклеотидных связях, 2'-О-метиличования в одном, или более, или всех уридинах и 2'-О-метиличования в нуклеотиде, ближайшем к 3'-концу и/или 5'-концу нуклеотида, противоположного целевому аденозину,

5) 2'-О-метиличования в первых и последних 3 нуклеотидах, фосфоротиоата в первых и последних 3 межнуклеотидных связях, 2'-О-метиличования в одном, или более, или всех уридинах и фосфоротиоатную связь в нуклеотиде, противоположном целевому аденозину, и/или его 5' и/или 3' ближайших нуклеотидах,

6) 2'-О-метиличования в первых и последних от 1 до 5 нуклеотидах и/или фосфоротиоата в первых и последних от 1 до 5 межнуклеотидных связях.

21. dPHK по п. 20, где модификация в нуклеотиде, противоположном целевому аденозину, и/или одном или двух нуклеотидах, ближайших к нуклеотиду, противоположному целевому аденозину, представляет собой 2'-О-метиличование и/или фосфоротиоатную связь.

22. dPHK по любому из пп. 1-21, не содержащая домен, рекрутирующий ADAR (аденозиндезаминаза, действующая на РНК), способный образовывать внутримолекулярную структуру "петля-на-стебле" для связывания фермента ADAR.

23. Конструкция, содержащая или кодирующая dPHK по любому из пп. 1-22.

24. Способ редактирования целевой РНК в клетке-хозяине, включающий введение dPHK по любому из пп. 1-23 в клетку-хозяин.

25. Способ по п. 24, дополнительно включающий введение ингибитора ADAR3 в клетку-хозяин.

26. Способ по п. 24 или п. 25, дополнительно включающий введение стимулятора интерферона в клетку-хозяин.

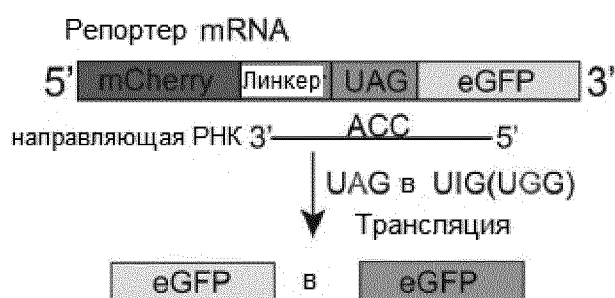
27. Способ по любому из пп. 24-26, включающий введение множества dPHK, каждая из которых нацелена на другую целевую РНК.

28. Способ по любому из пп. 24-27, где dPHK не индуцирует иммунный ответ.

29. Способ по любому из пп. 24-28, дополнительно включающий введение экзогенного ADAR в клетку-хозяин.

30. Способ по п. 29, где ADAR представляет собой ADAR1, содержащий мутацию E1008.

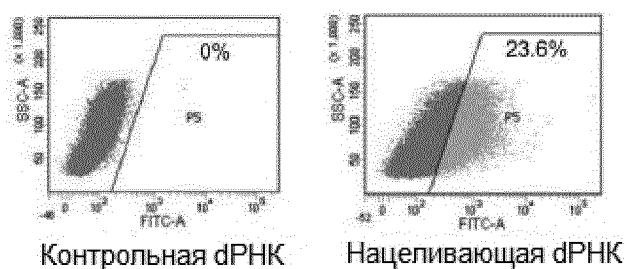
31. Конструкция, композиция, клетка, библиотека или набор, содержащий dPHK по любому из пп. 1-23.



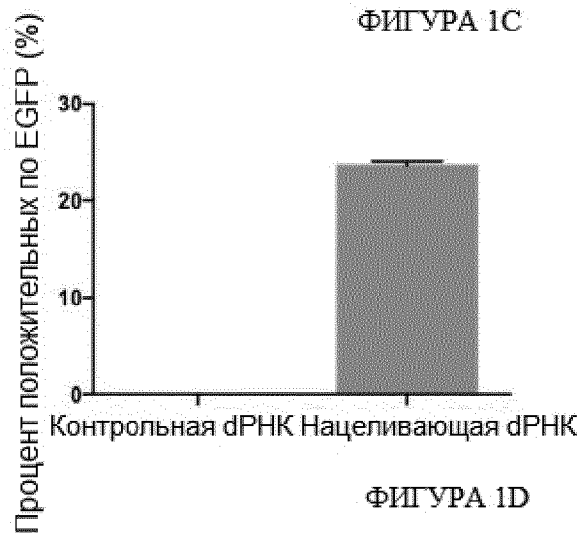
ФИГУРА 1А



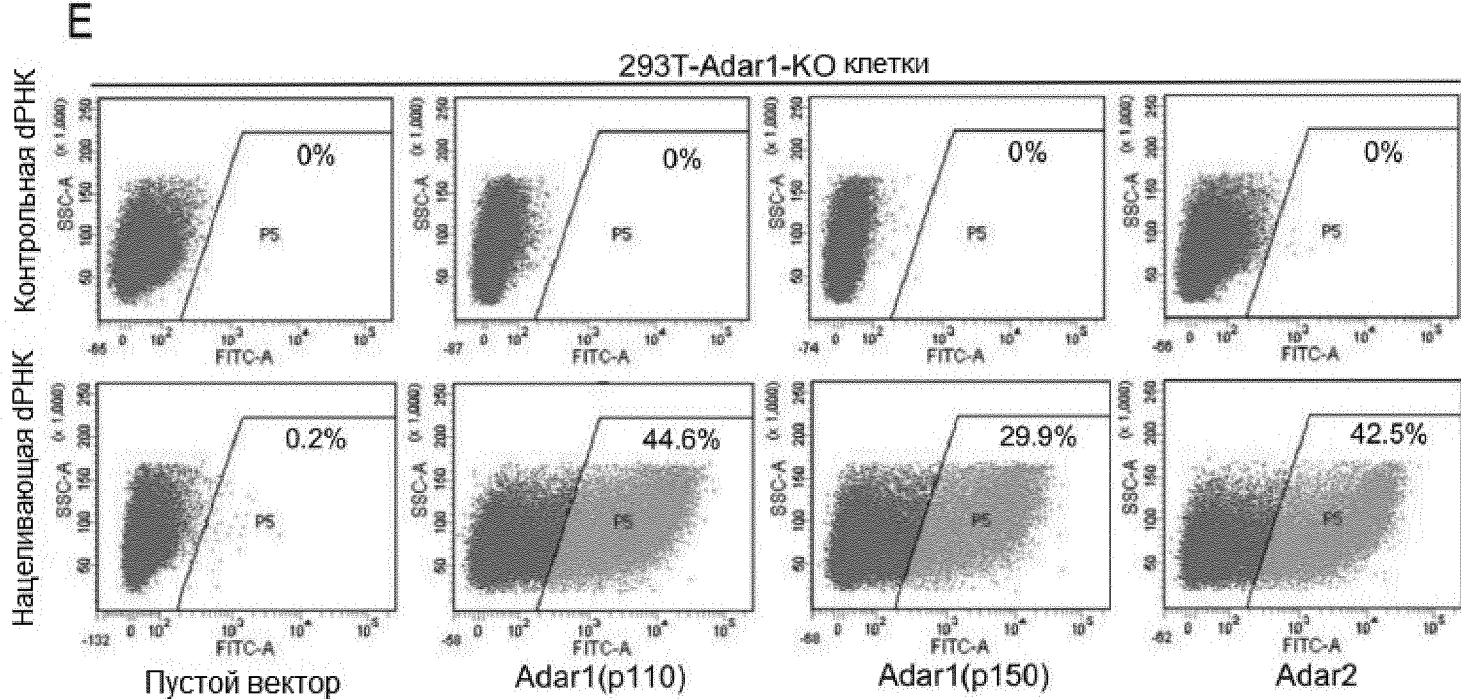
ФИГУРА 1В



ФИГУРА 1С



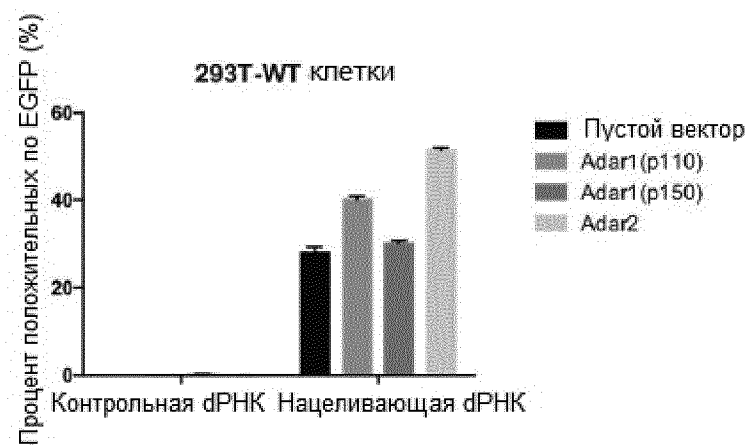
ФИГУРА 1D



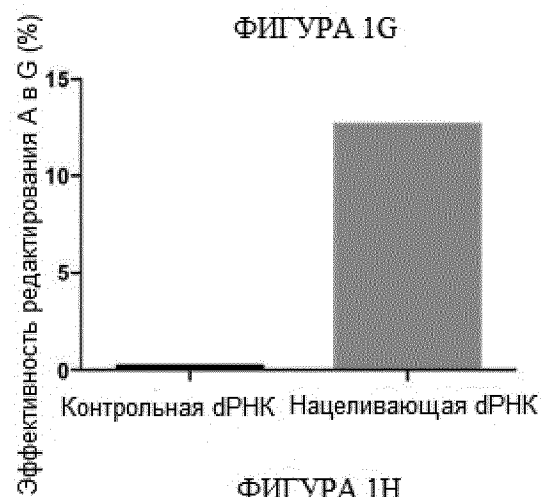
ФИГУРА 1Е



ФИГУРА 1F



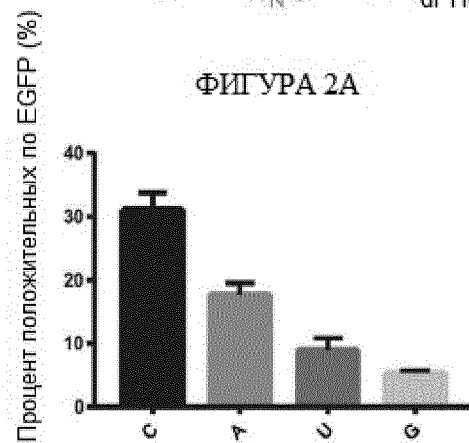
ФИГУРА 1G



ФИГУРА 1H



ФИГУРА 2А

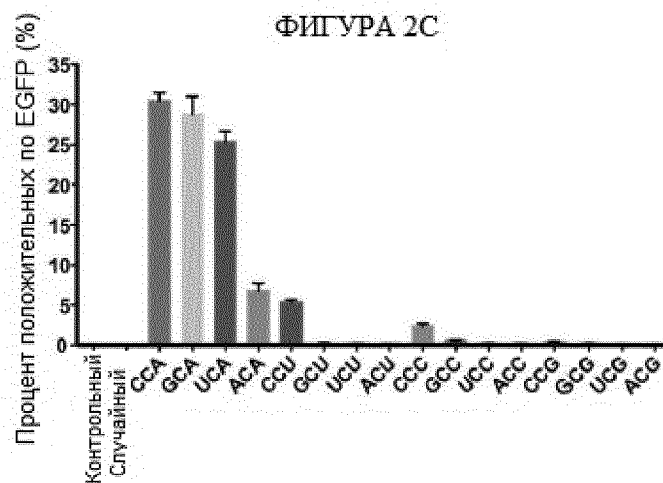


[N] основание, противоположное целевому A

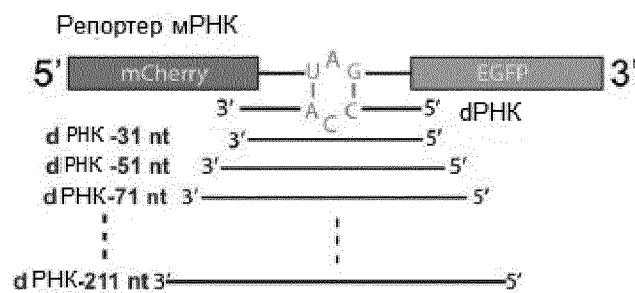
ФИГУРА 2В



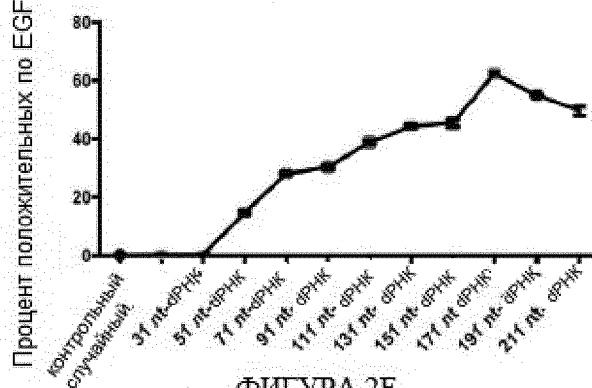
ФИГУРА 2С

N₁ C N₂ основания, противоположные сайтам TAG

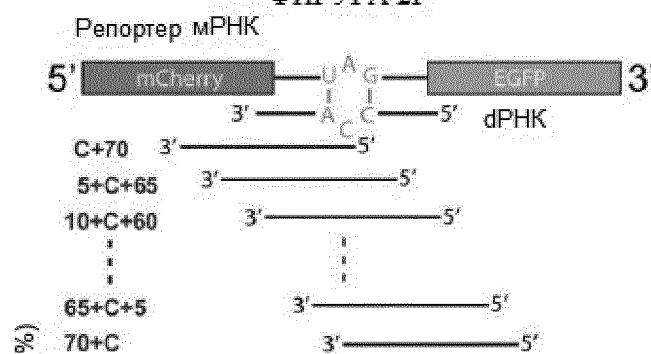
ФИГУРА 2D



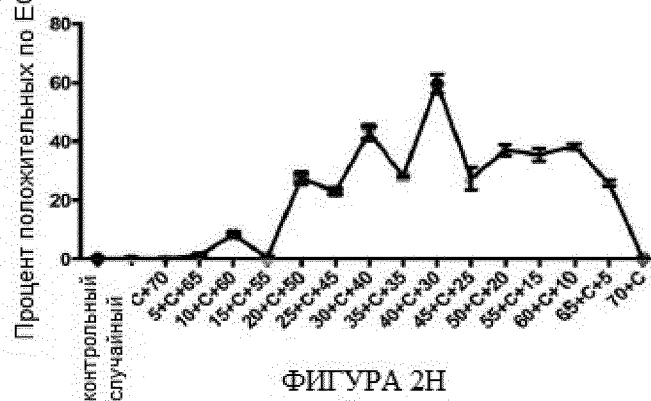
ФИГУРА 2Е



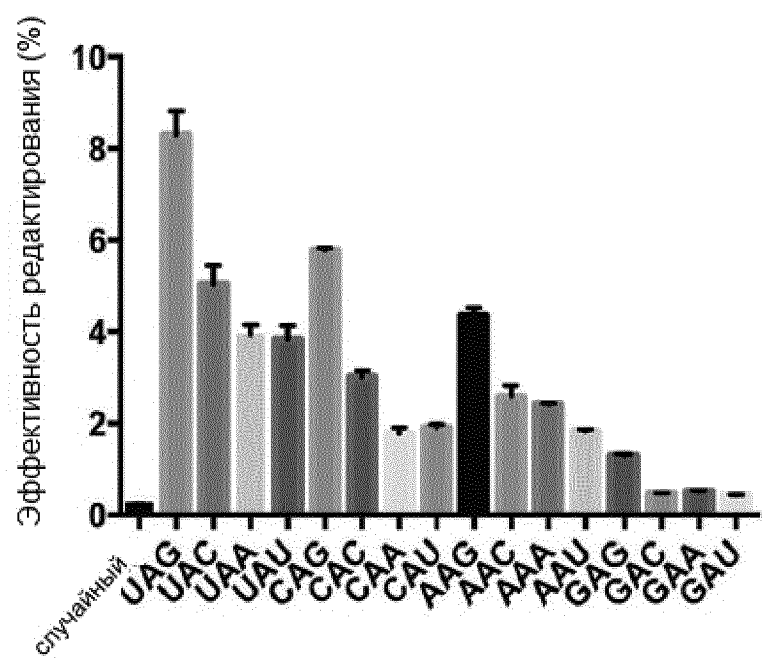
ФИГУРА 2F



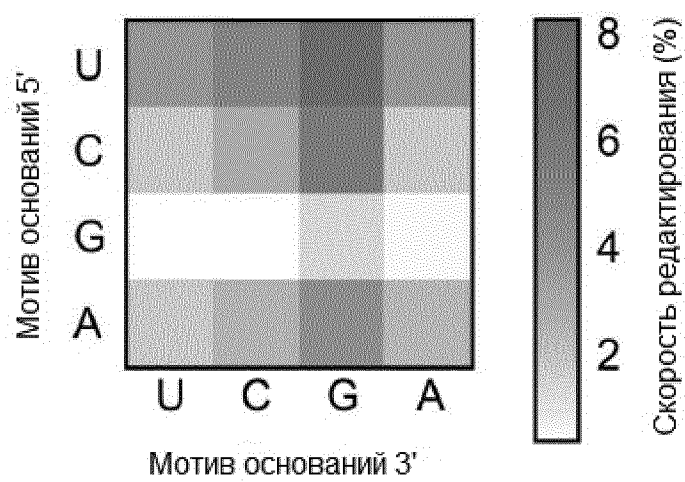
ФИГУРА 2G



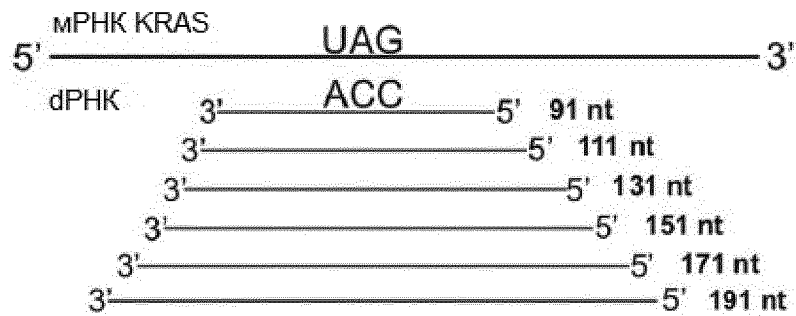
ФИГУРА 2H



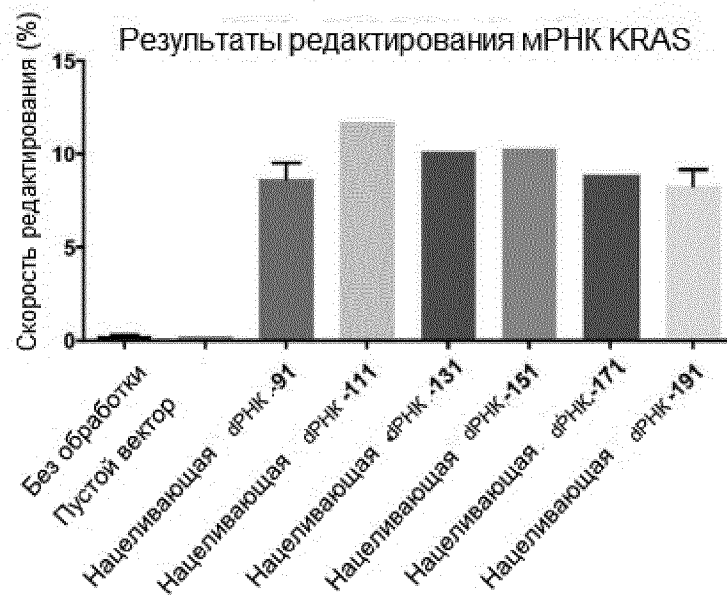
ФИГУРА 3А



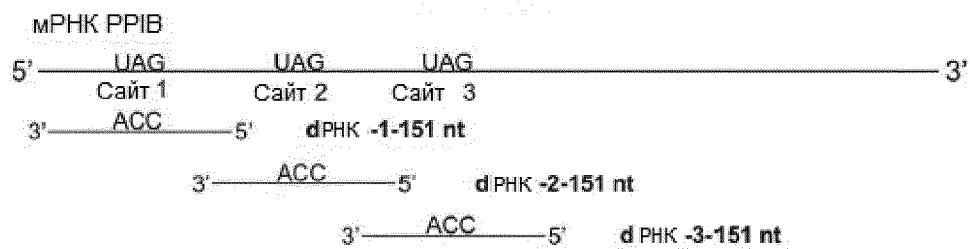
ФИГУРА 3В



ФИГУРА 4А

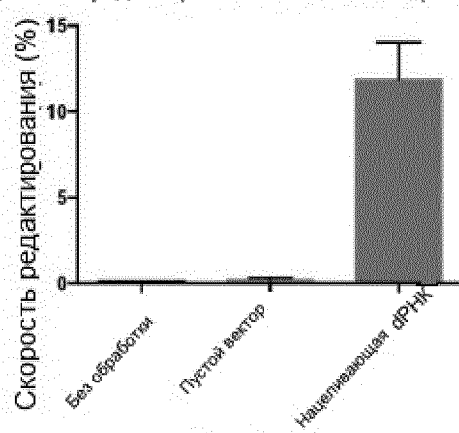


ФИГУРА 4В



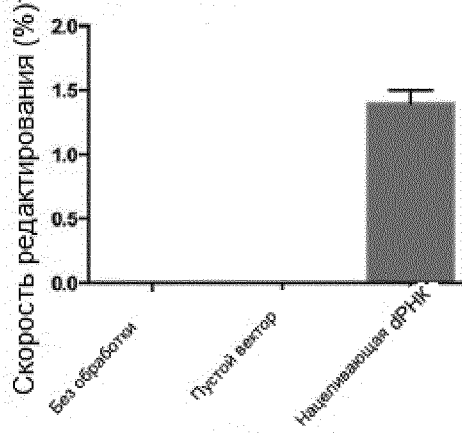
ФИГУРА 4С

Результаты редактирования мРНК РР1В (Сайт 1)



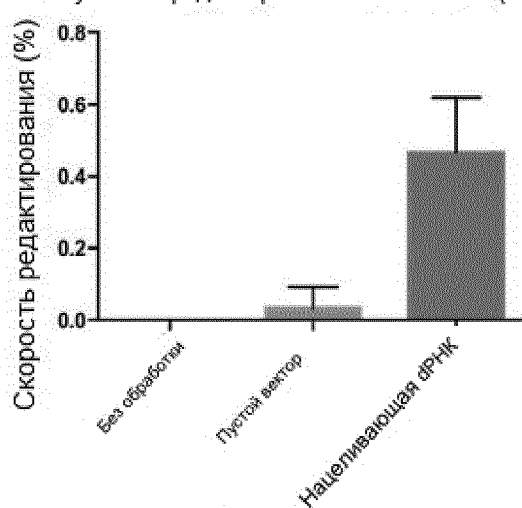
ФИГУРА 4D

Результаты редактирования мРНК РР1В (Сайт 2)



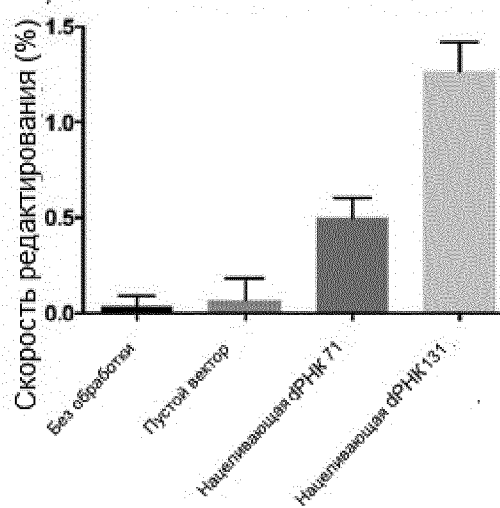
ФИГУРА 4E

Результаты редактирования мРНК РР1В (Сайт 3)

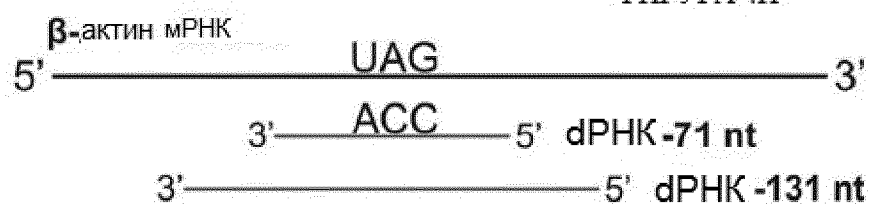


ФИГУРА 4F

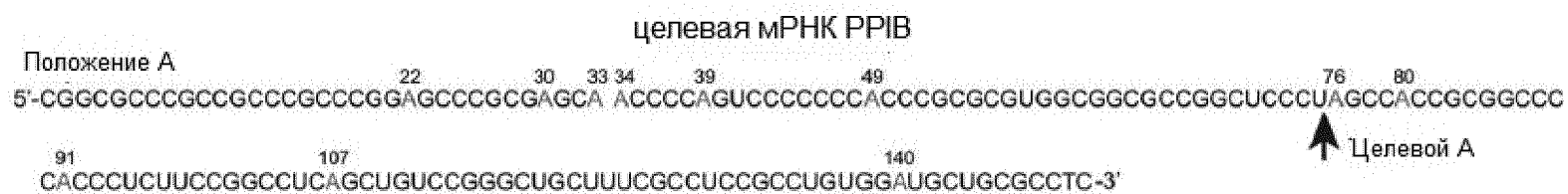
Результаты редактирования мРНК актина (Сайт 1)



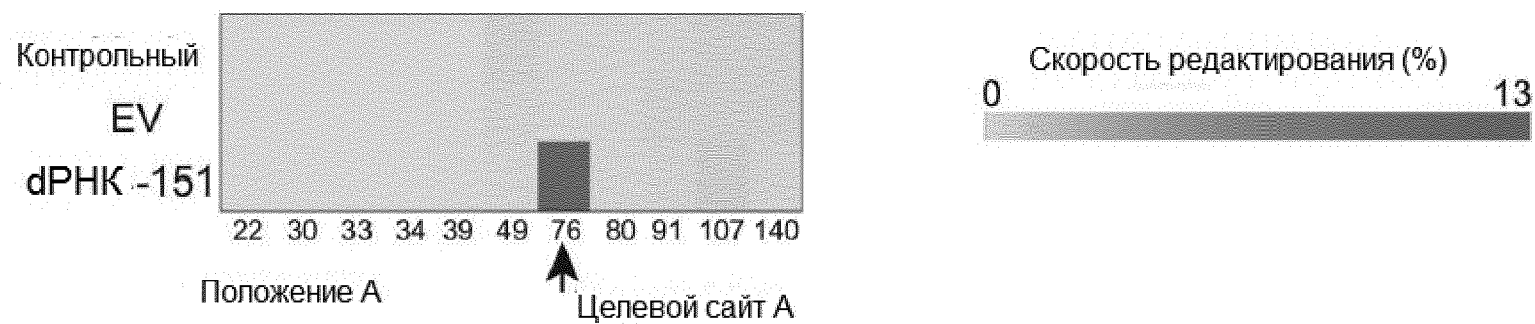
ФИГУРА 4H



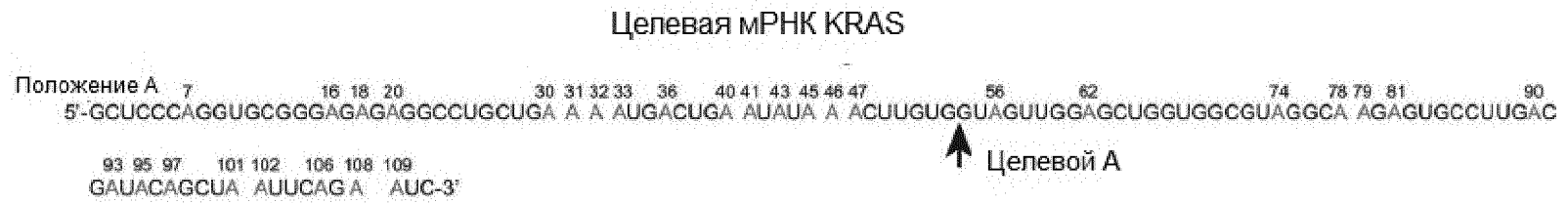
ФИГУРА 4G



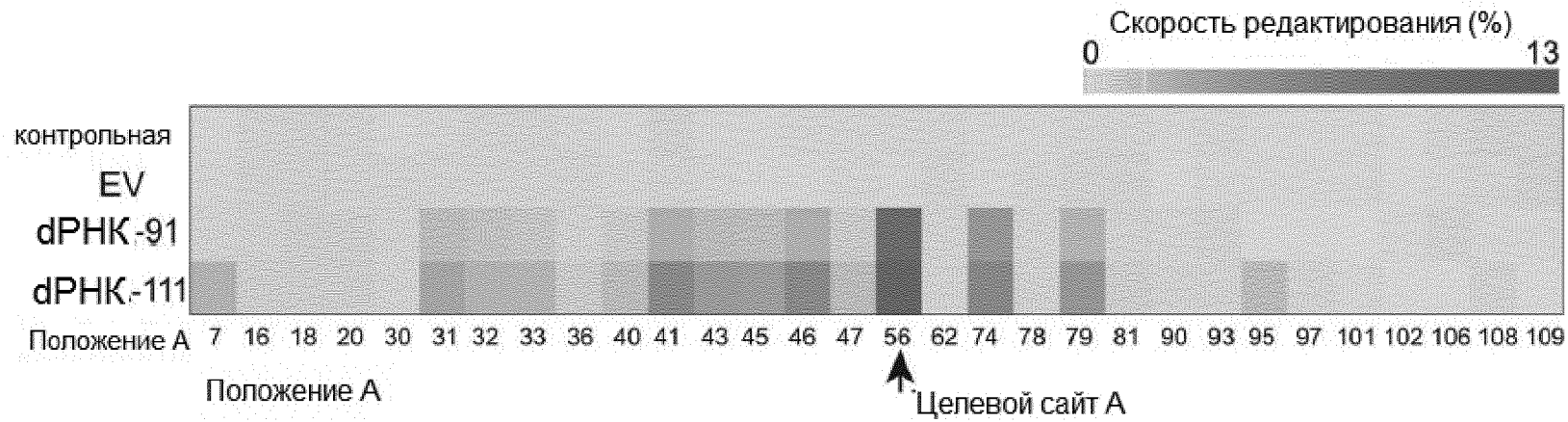
ФИГУРА 5А



ФИГУРА 5В



ФИГУРА 5C

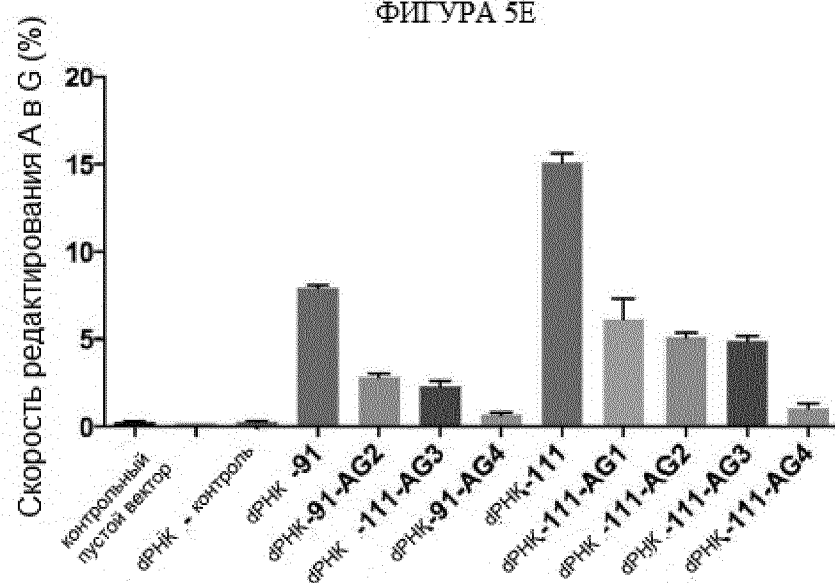


ФИГУРА 5D

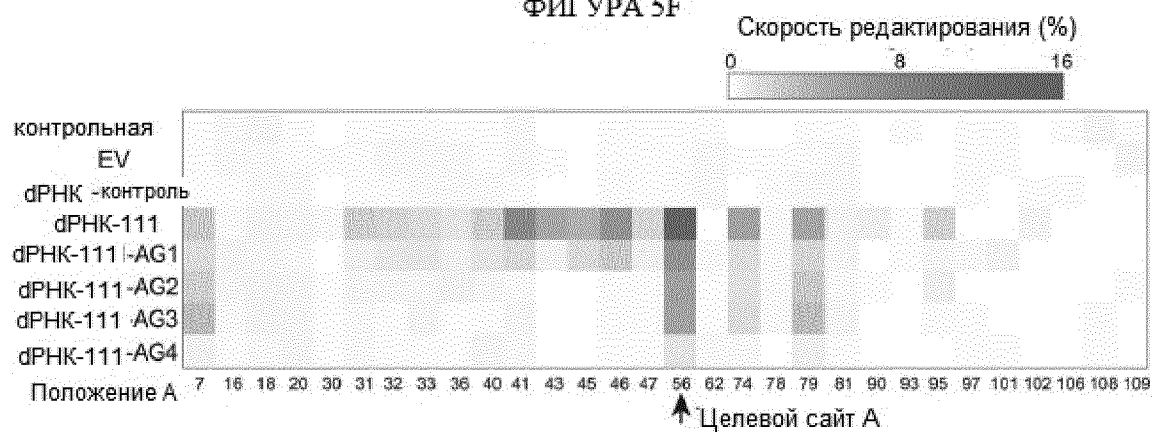
Сайты ошибочно спаренных оснований A-G

dPHK -AG1: A₄₁, A₄₆, A₇₄dPHK -AG2: A₄₁, A₄₃, A₄₅, A₄₆, A₇₄, A₇₉dPHK -AG3: A₃₁, A₃₂, A₃₃, A₄₁, A₄₃, A₄₅, A₄₆, A₄₇, A₇₄, A₇₉dPHK -AG4: A₇, A₃₁, A₃₂, A₃₃, A₄₀, A₄₁, A₄₃, A₄₅, A₄₆, A₄₇, A₇₄, A₇₉, A₈₅

ФИГУРА 5E

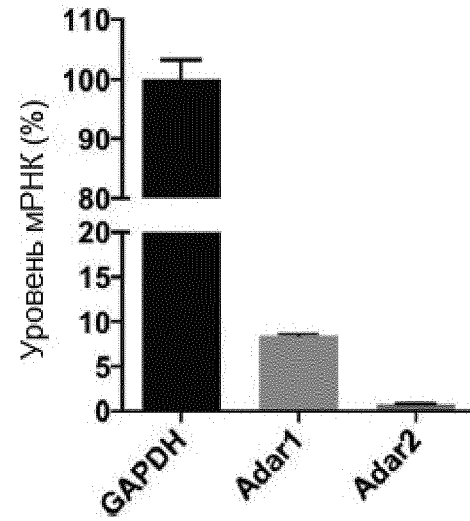
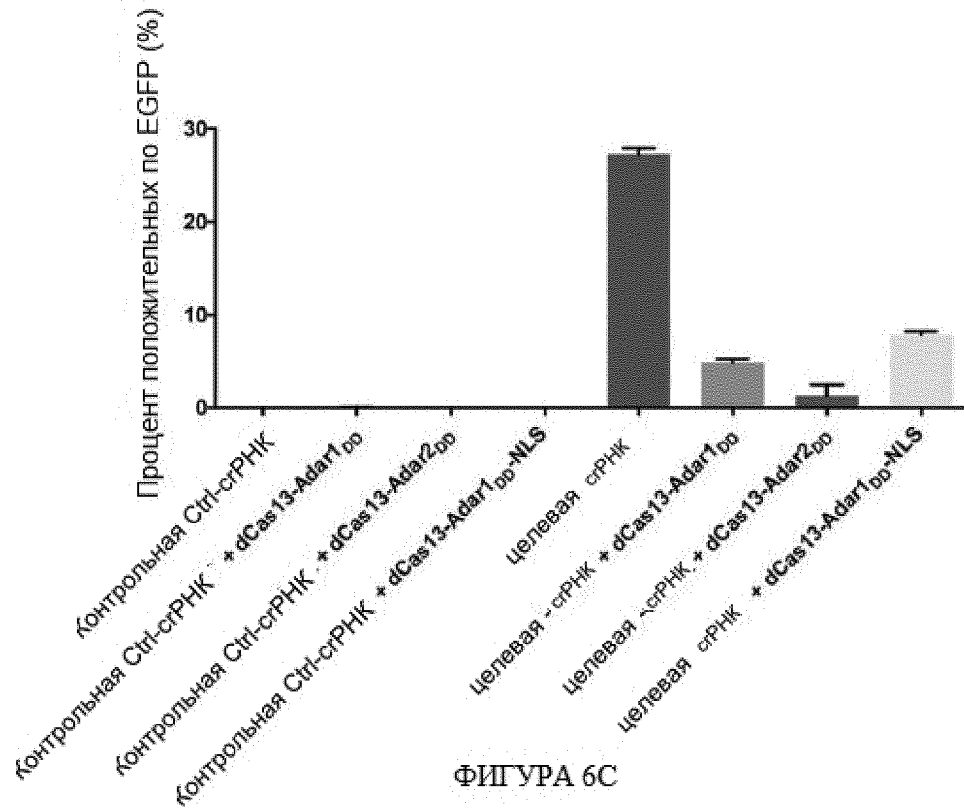


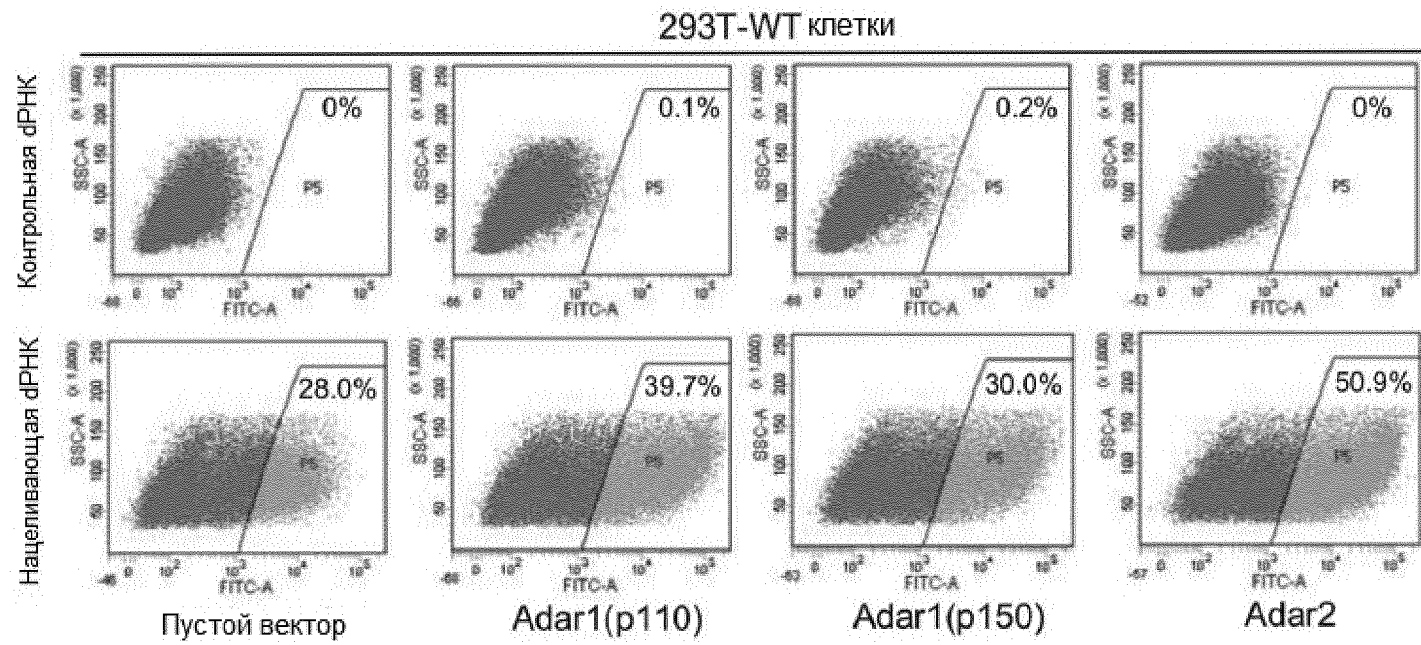
ФИГУРА 5F



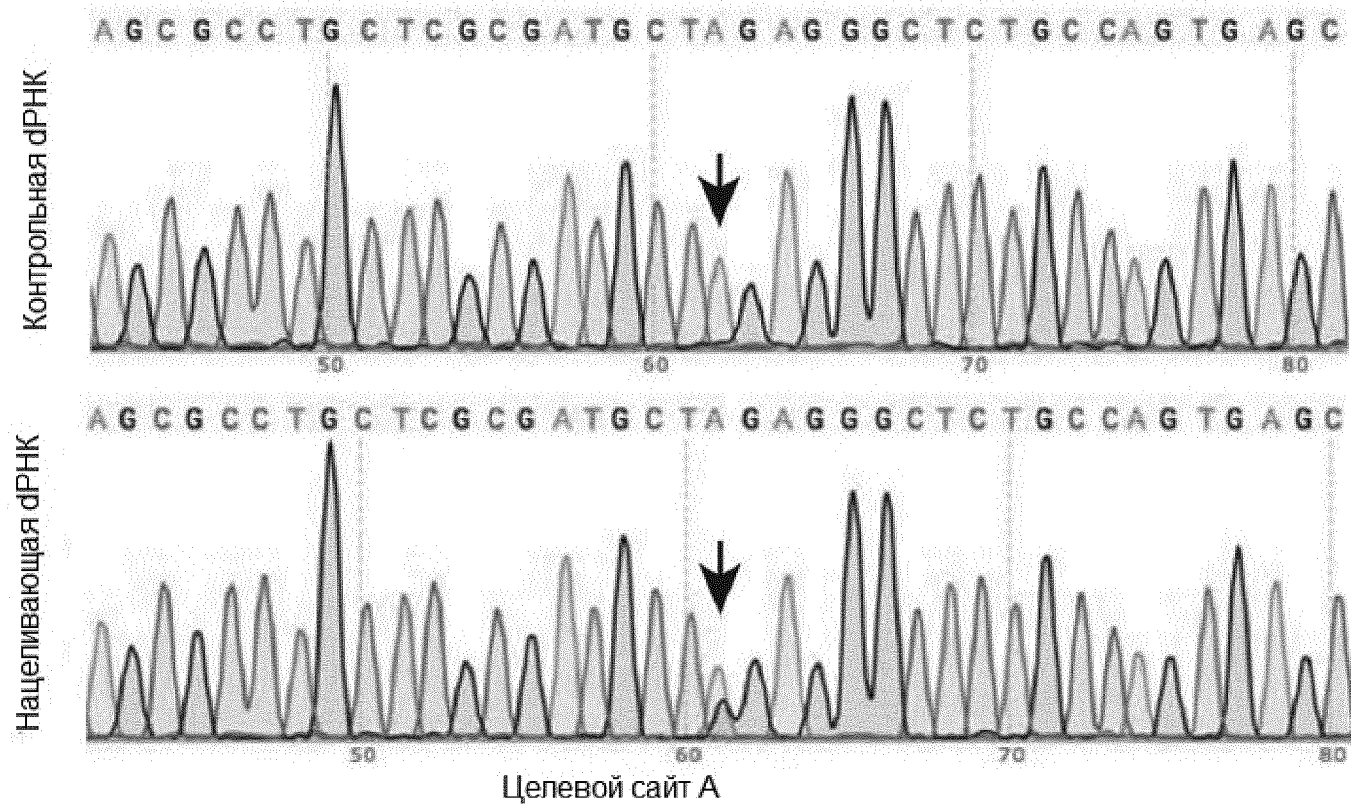
ФИГУРА 5G



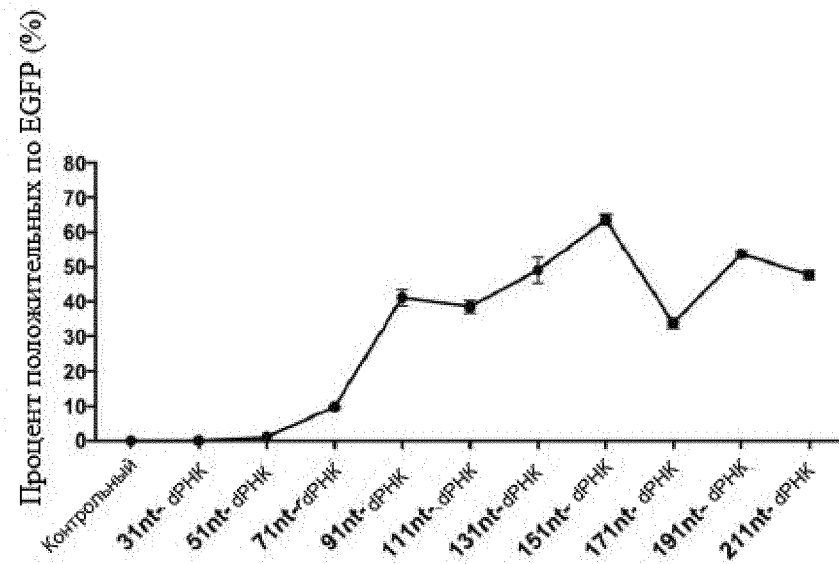
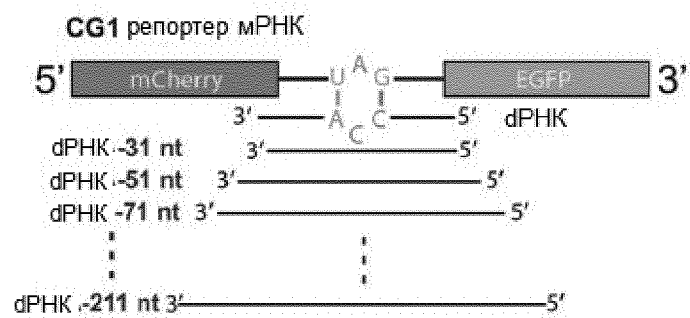




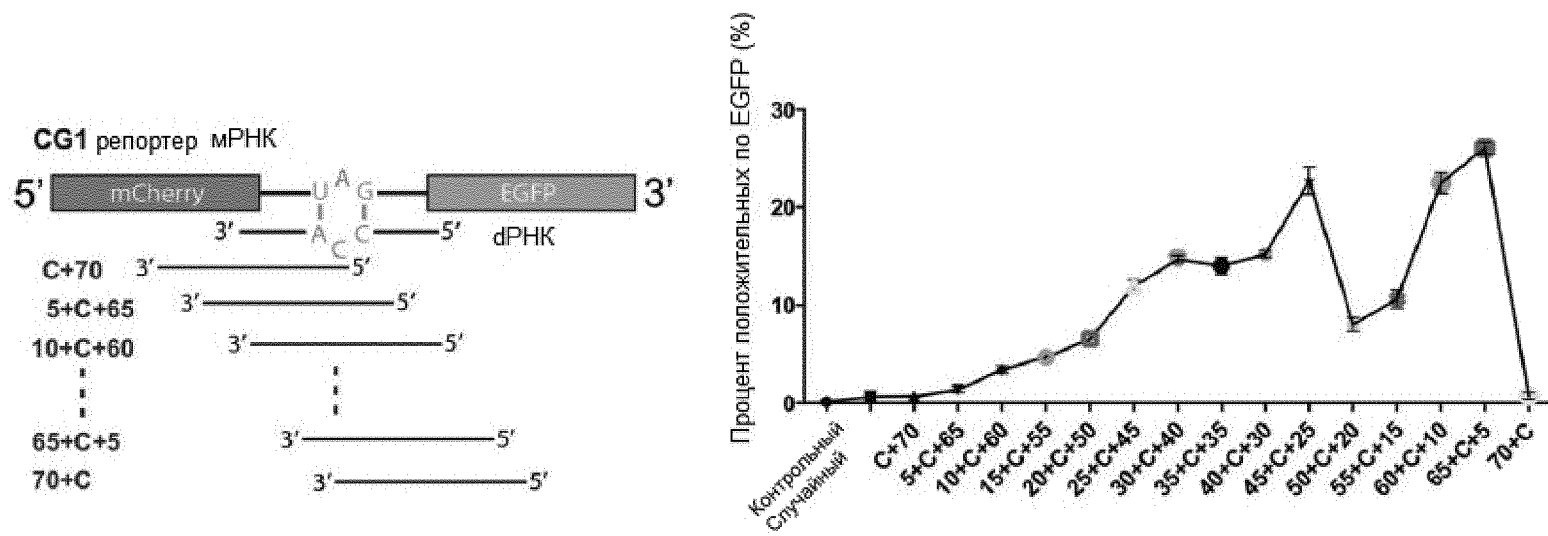
ФИГУРА 6G



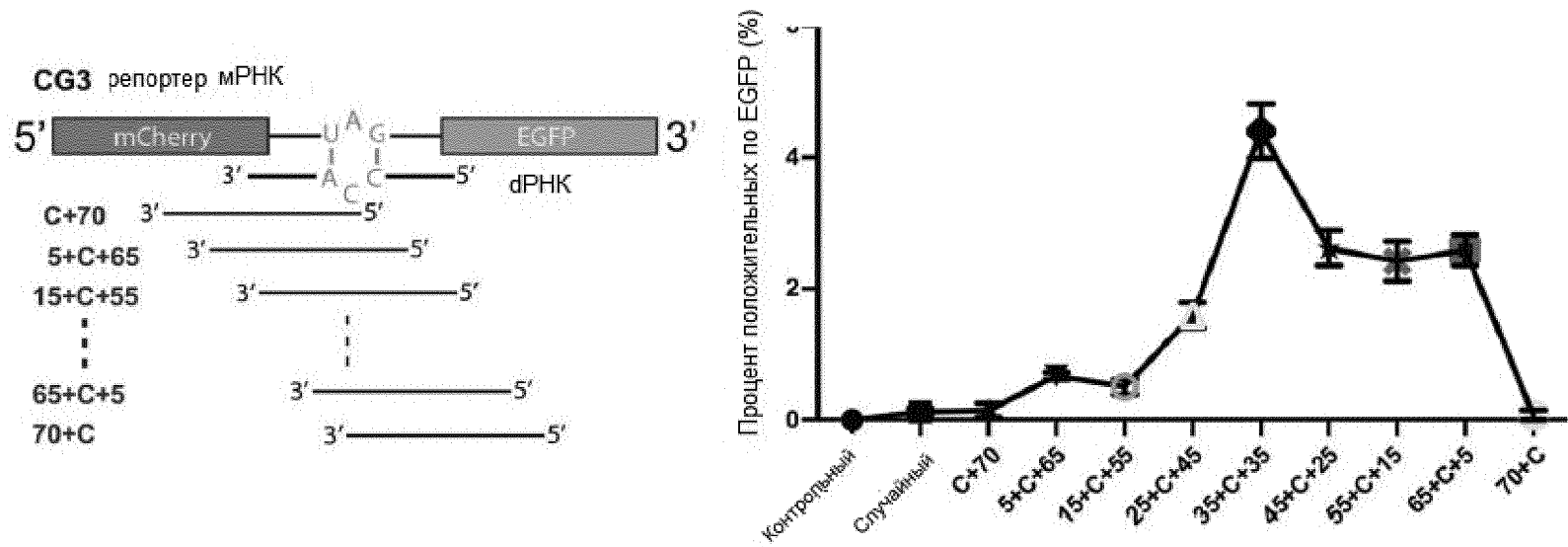
ФИГУРА 6H



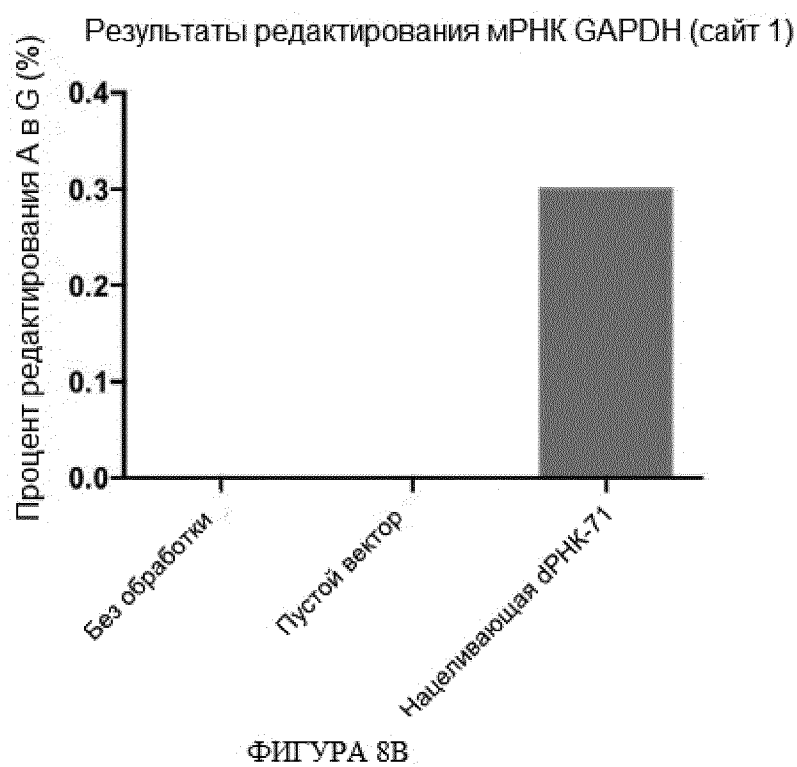
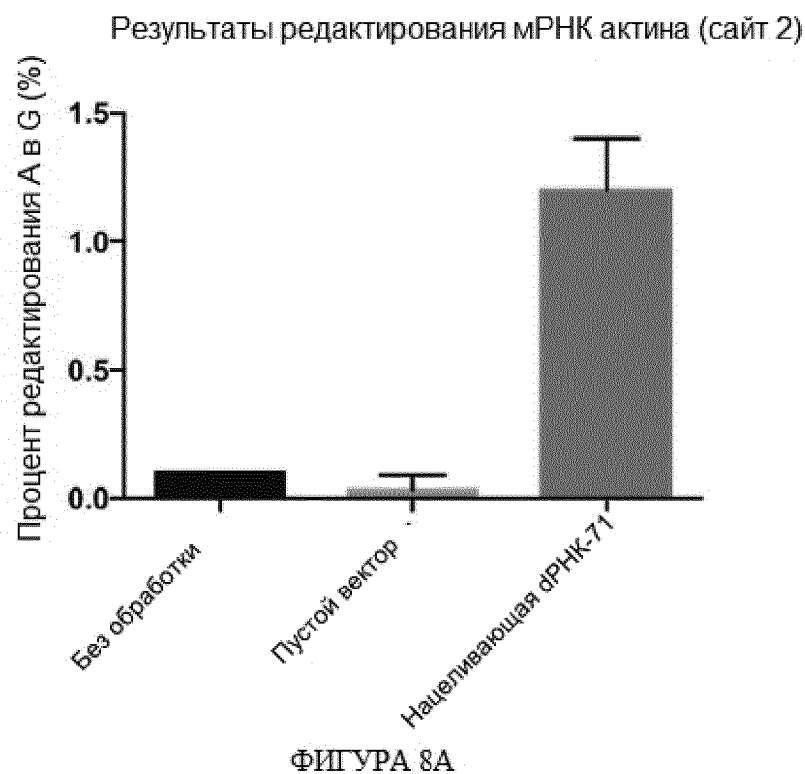
ФИГУРА 7А



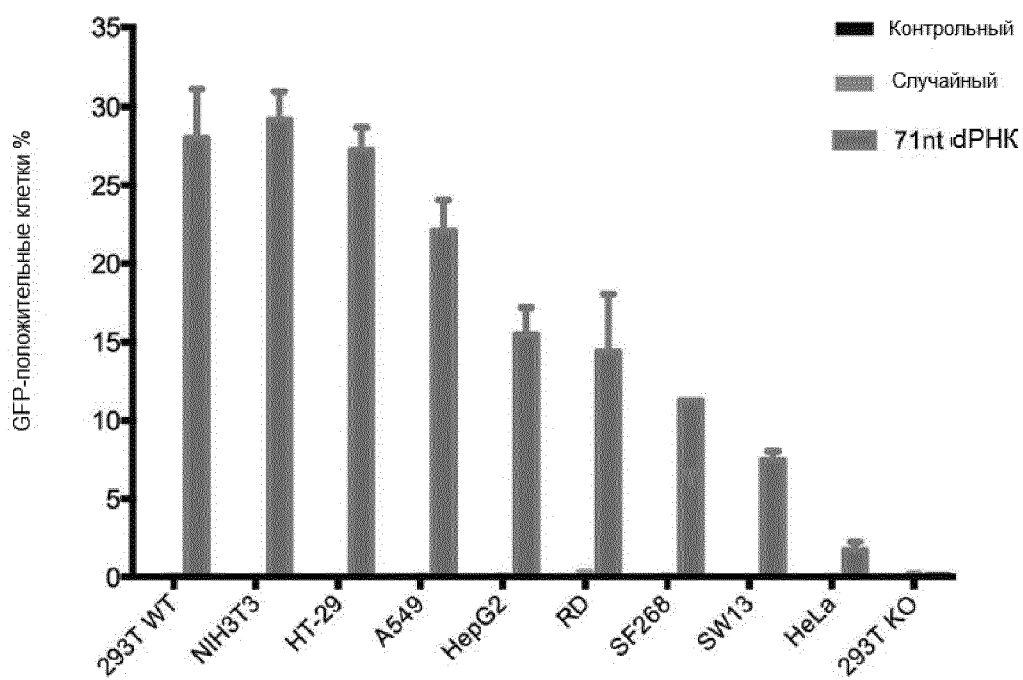
ФИГУРА 7В



ФИГУРА 7С



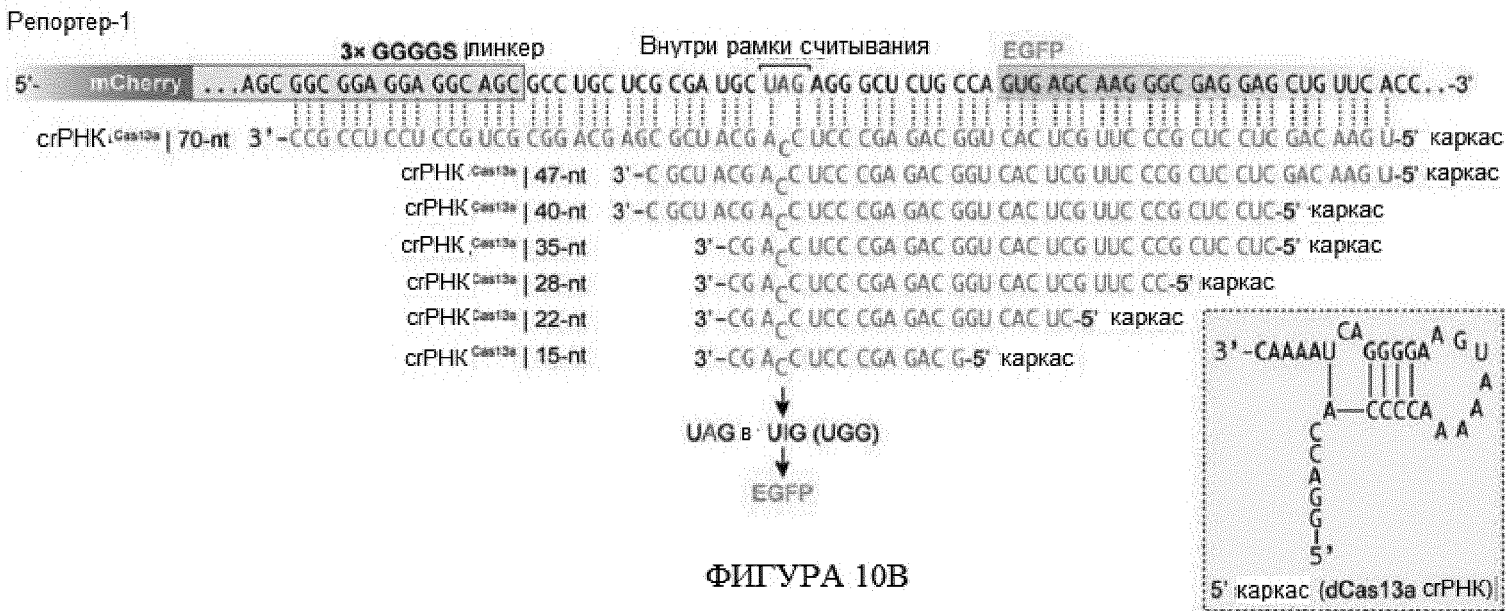
Тест на множестве клеточных линий



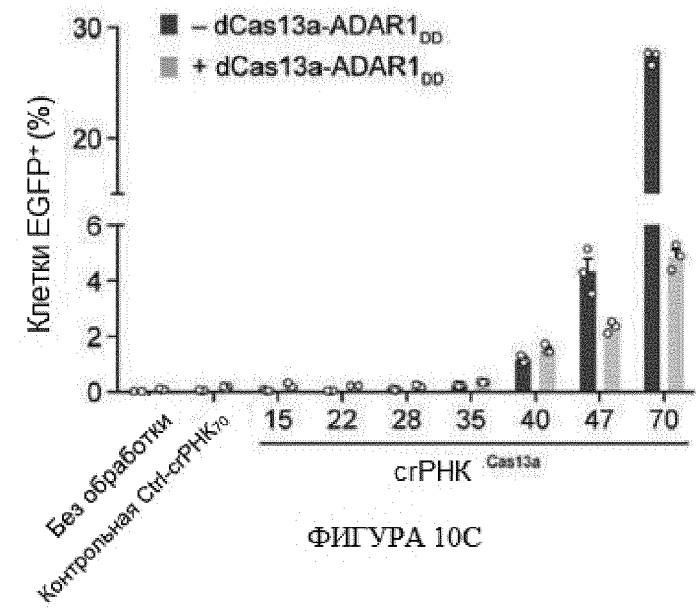
ФИГУРА 9



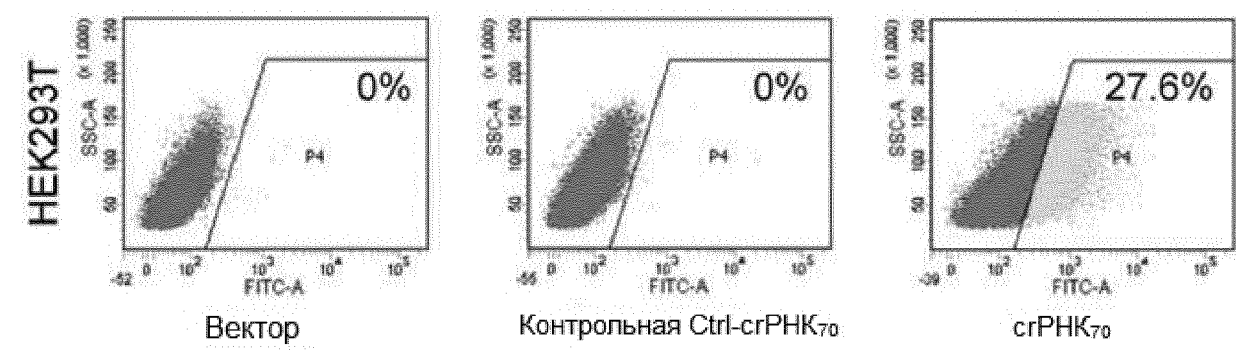
ФИГУРА 10А



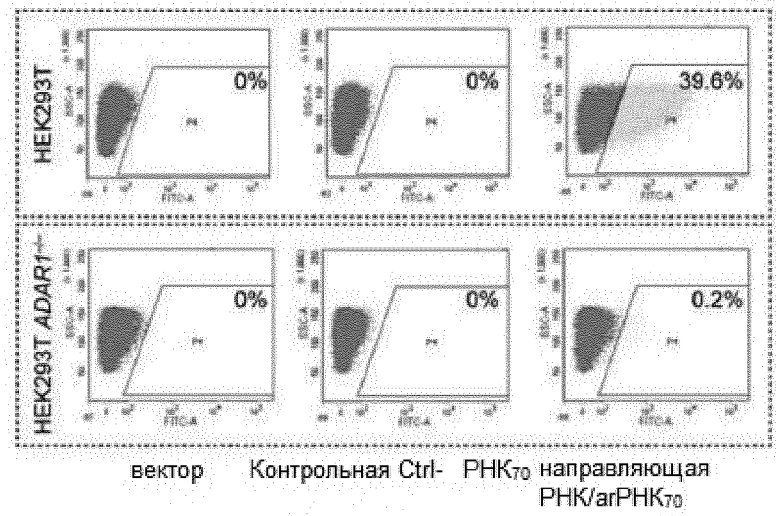
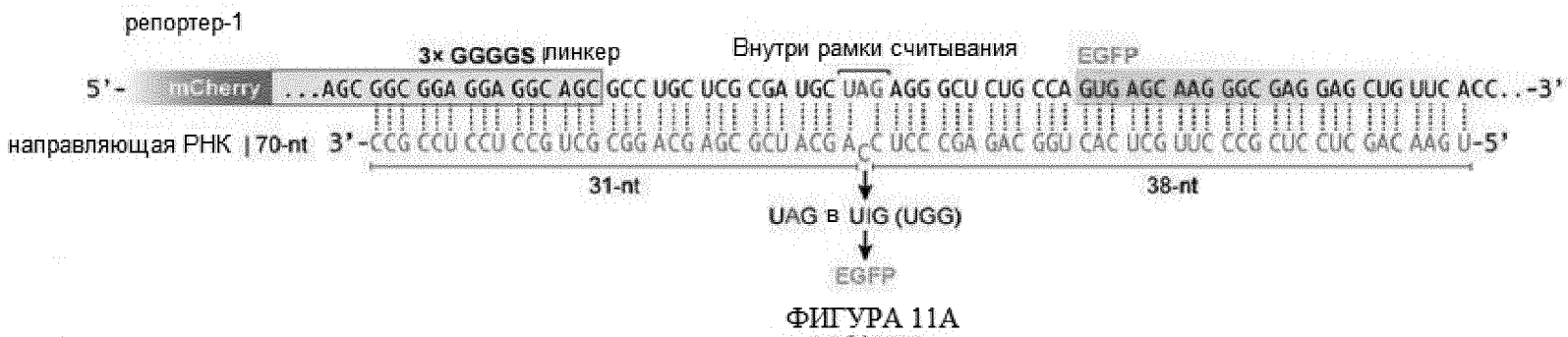
ФИГУРА 10В



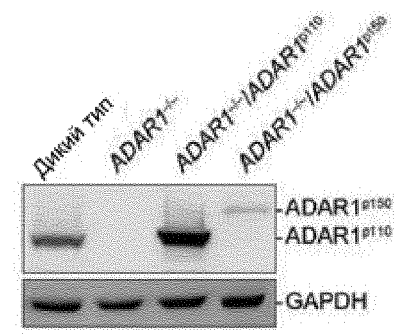
ФИГУРА 10С



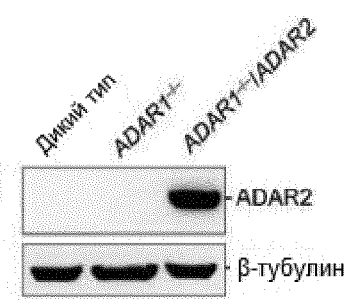
ФИГУРА 10D



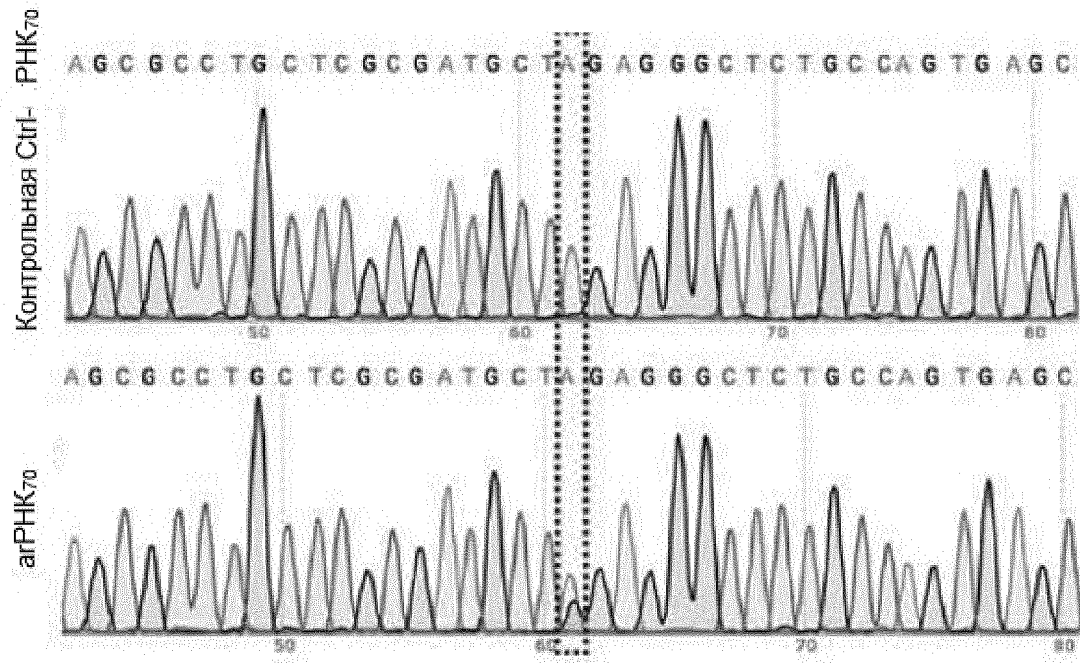
ФИГУРА 11В



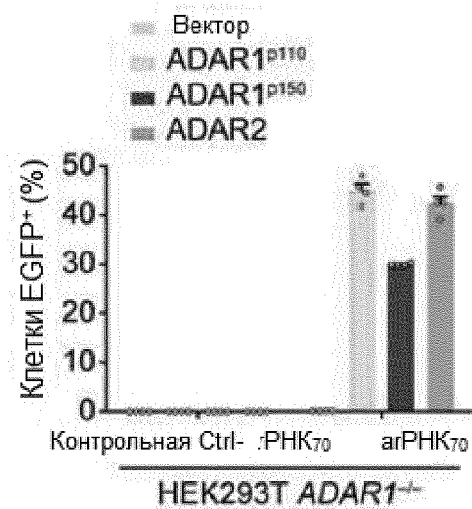
ФИГУРА 11С



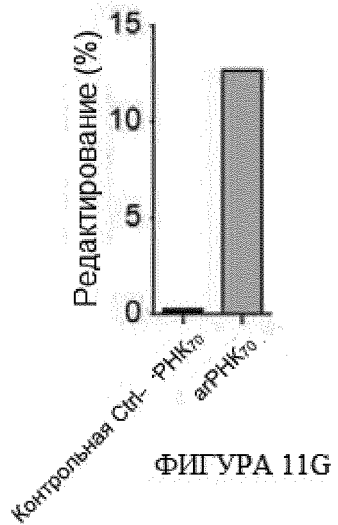
ФИГУРА 11D



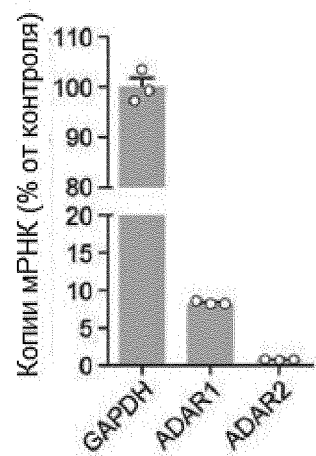
ФИГУРА 11F



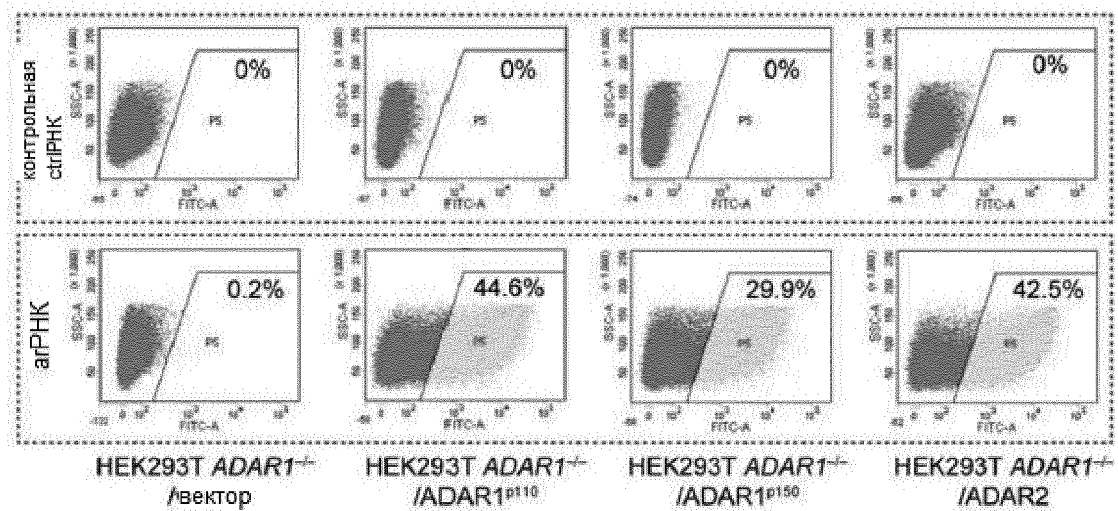
ФИГУРА 11E



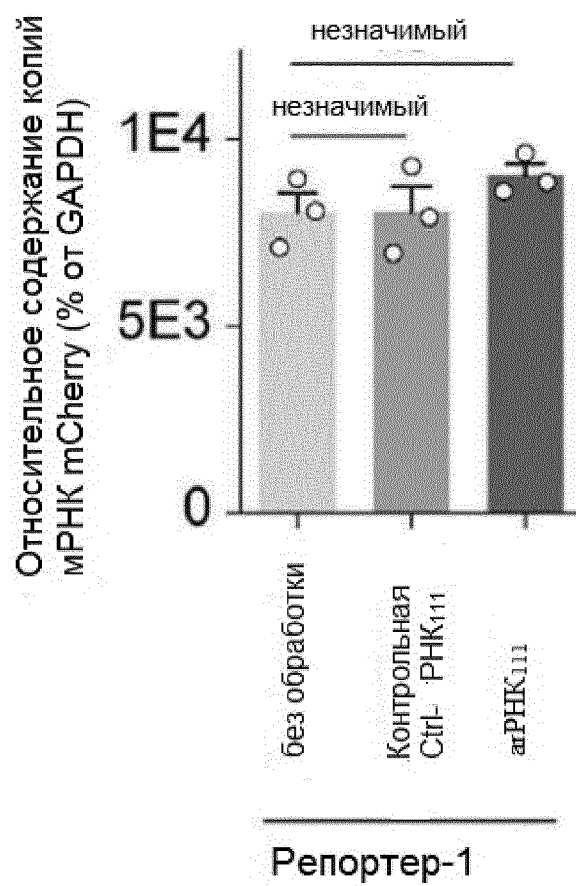
ФИГУРА 11G



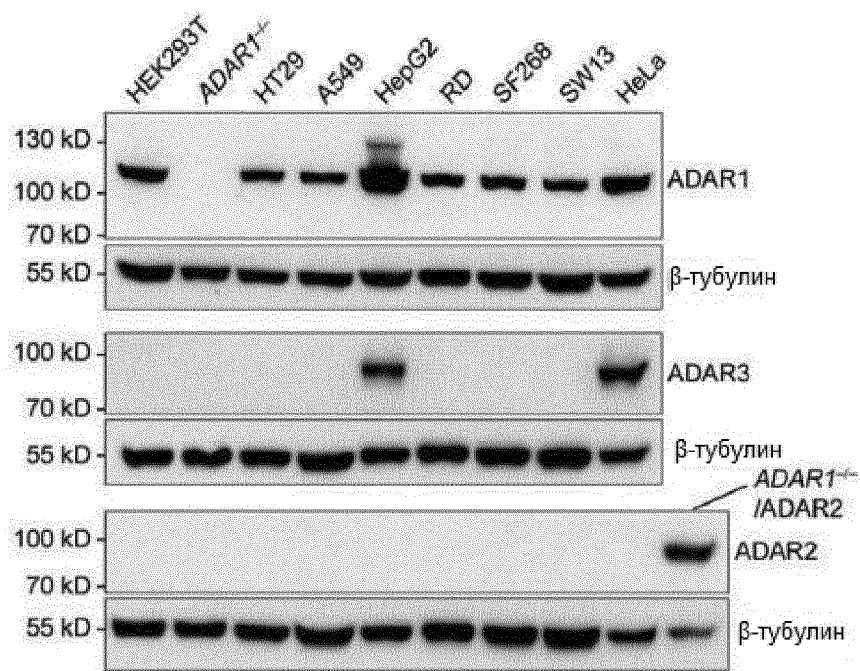
ФИГУРА 12А



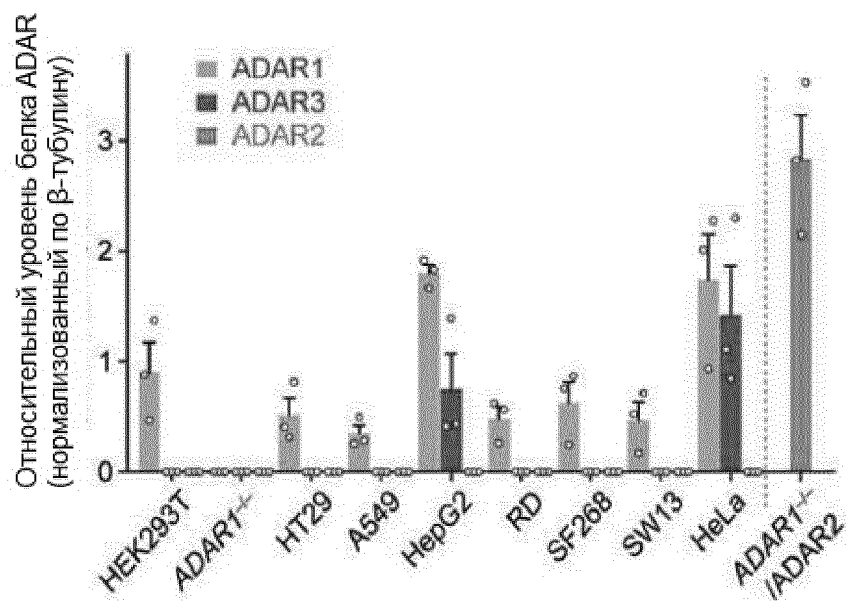
ФИГУРА 12В



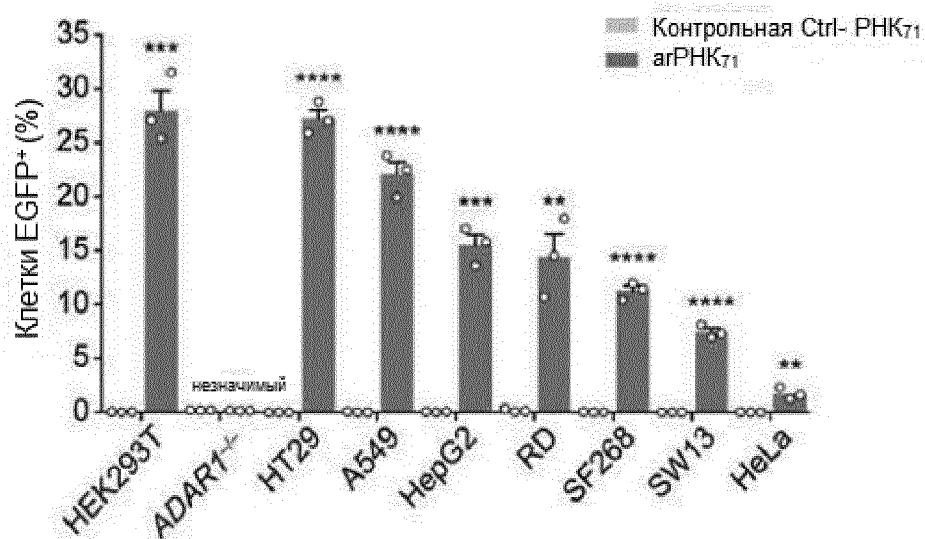
ФИГУРА 13



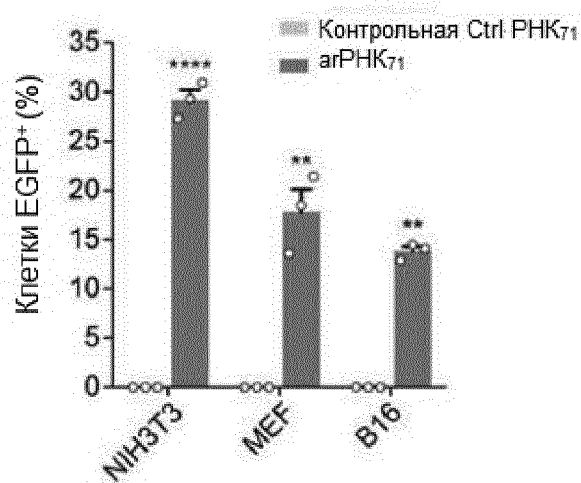
ФИГУРА 14А



ФИГУРА 14В



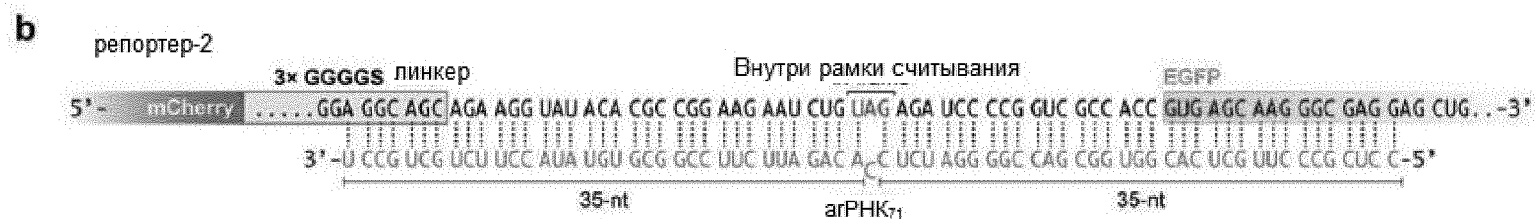
ФИГУРА 14С



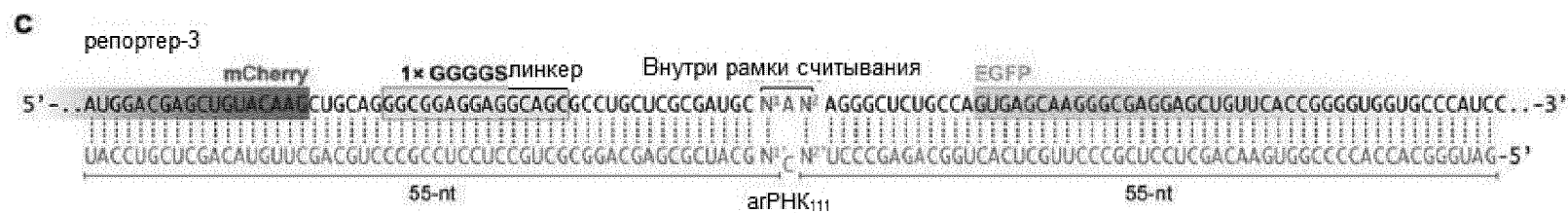
ФИГУРА 14D



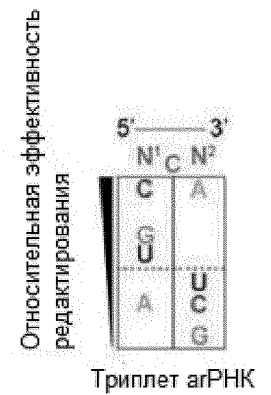
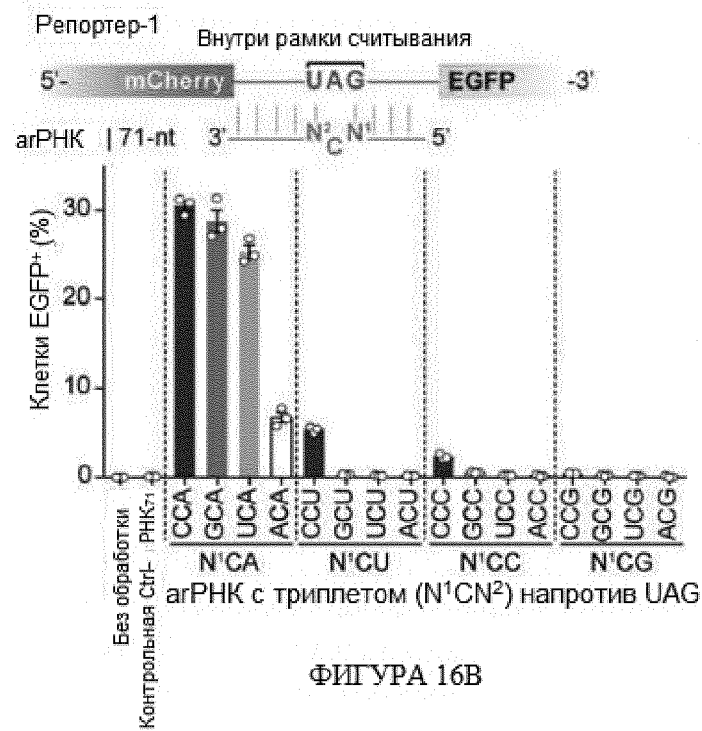
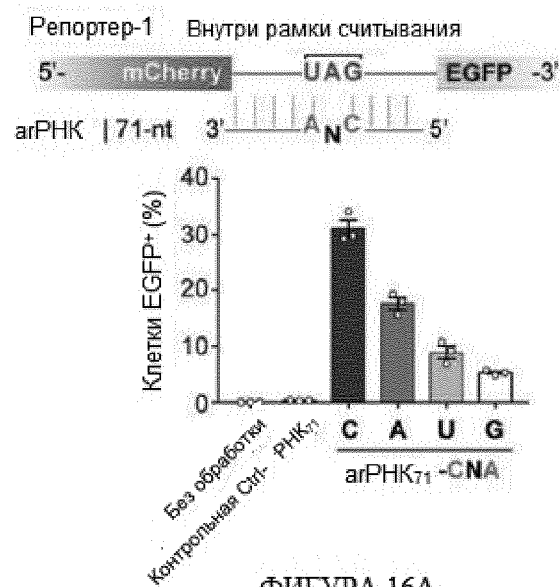
ФИГУРА 15А



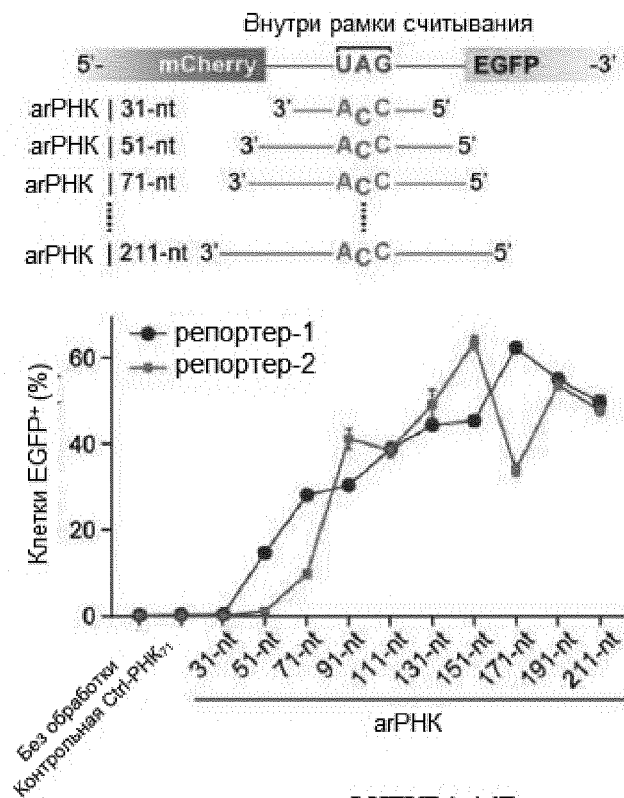
ФИГУРА 15В



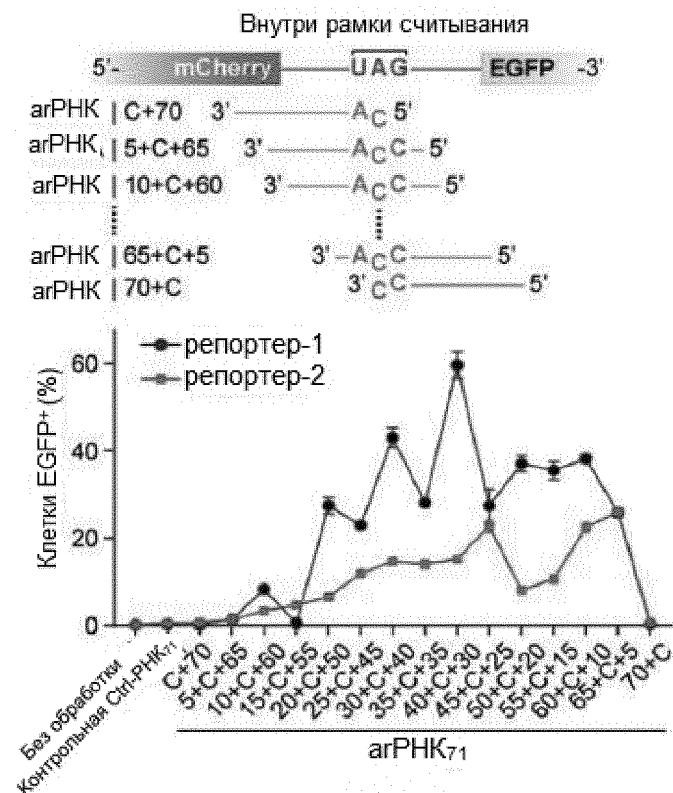
ФИГУРА 15С



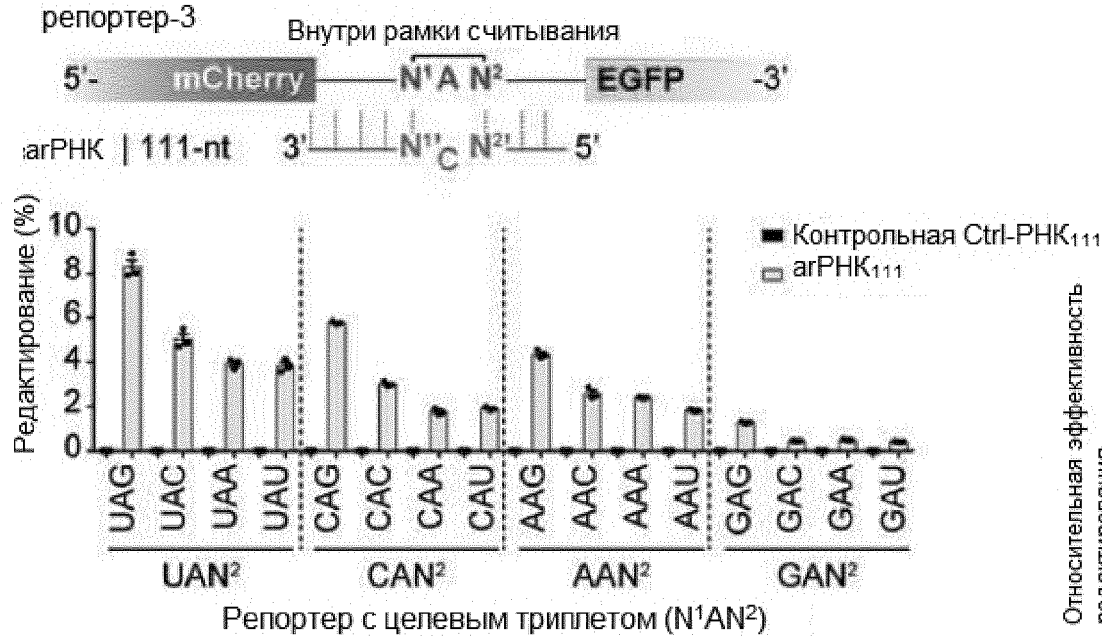
ФИГУРА 16С



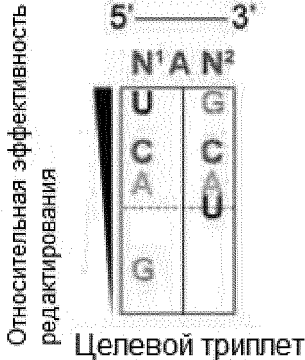
ФИГУРА 16D



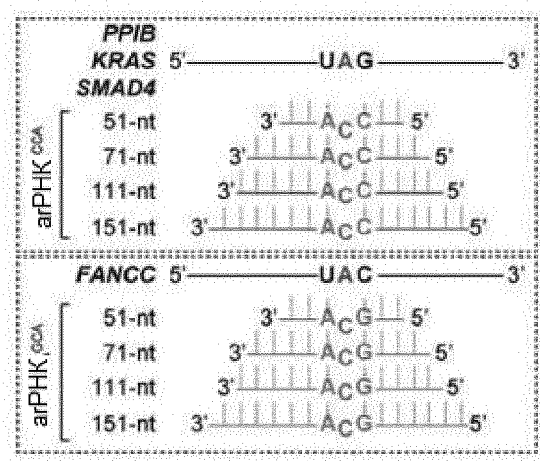
ФИГУРА 16E



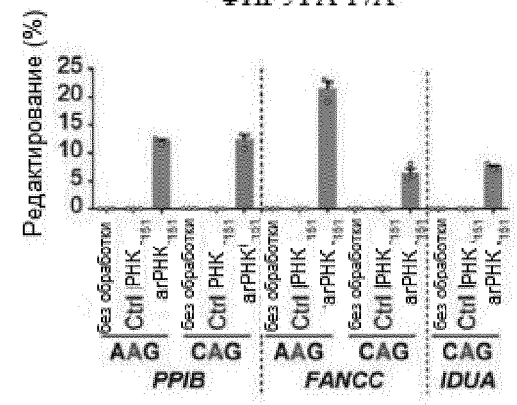
ФИГУРА 16F



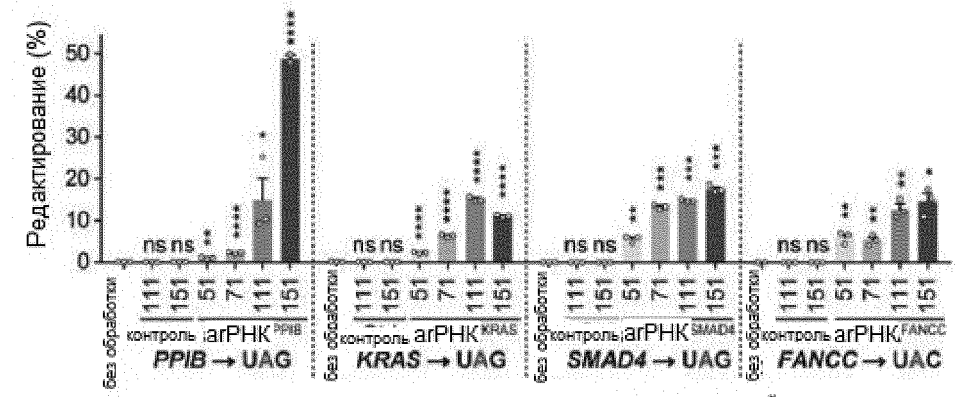
ФИГУРА 16G



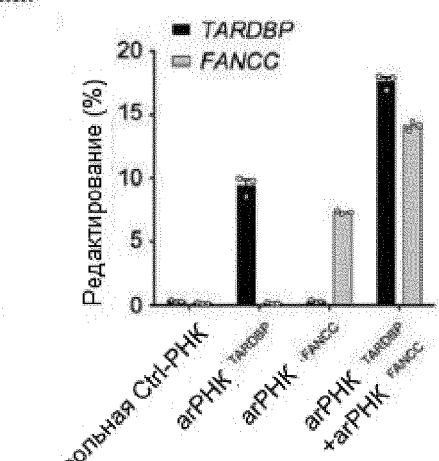
ФИГУРА 17А



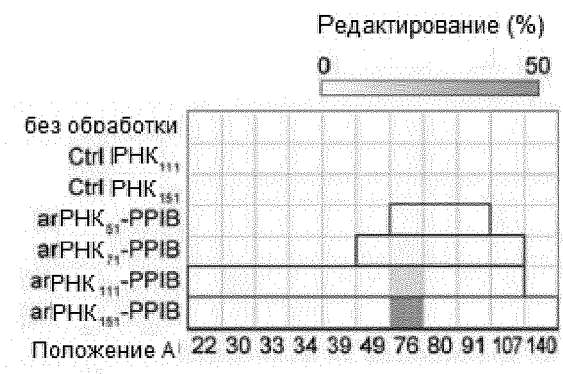
ФИГУРА 17С



ФИГУРА 17В

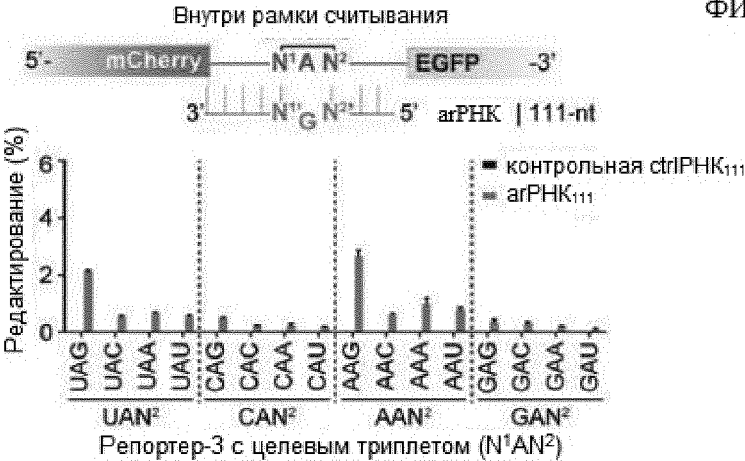
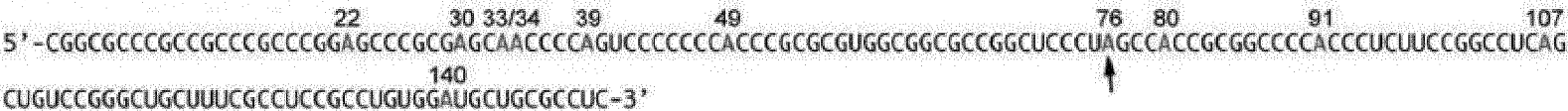


ФИГУРА 17D



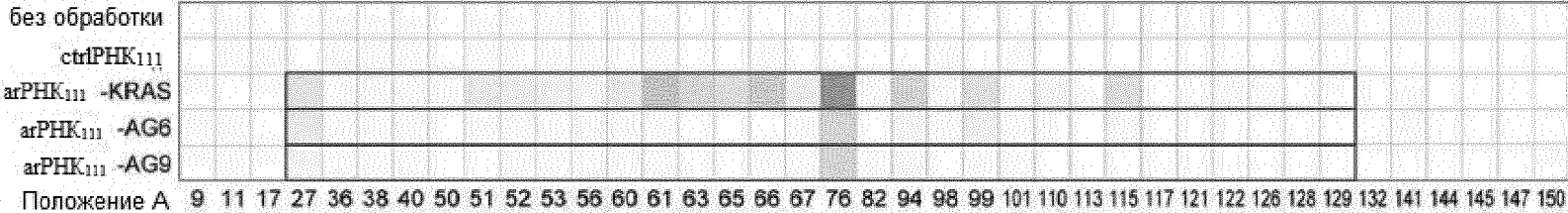
ФИГУРА 17Е

Нацеливание на транскрипт PPIB



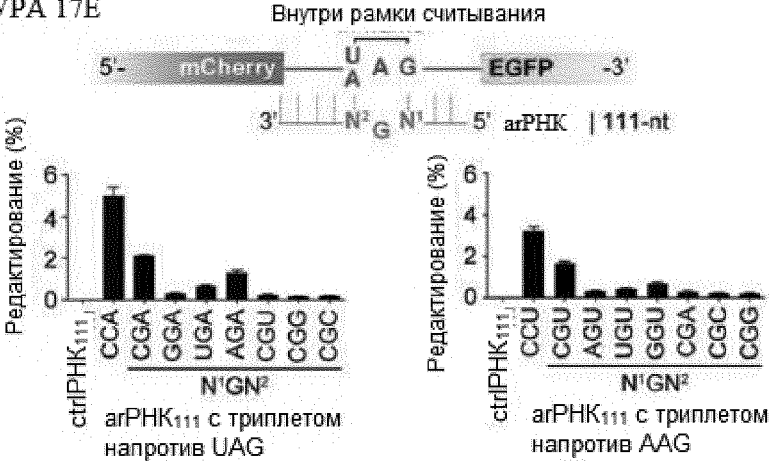
ФИГУРА 17G

arPHK₁₁₁ -AG6: A (61, 63, 65, 66, 94, 99)
arPHK₁₁₁ -AG9: A (27, 61, 63, 65, 66, 94, 98, 99, 115)

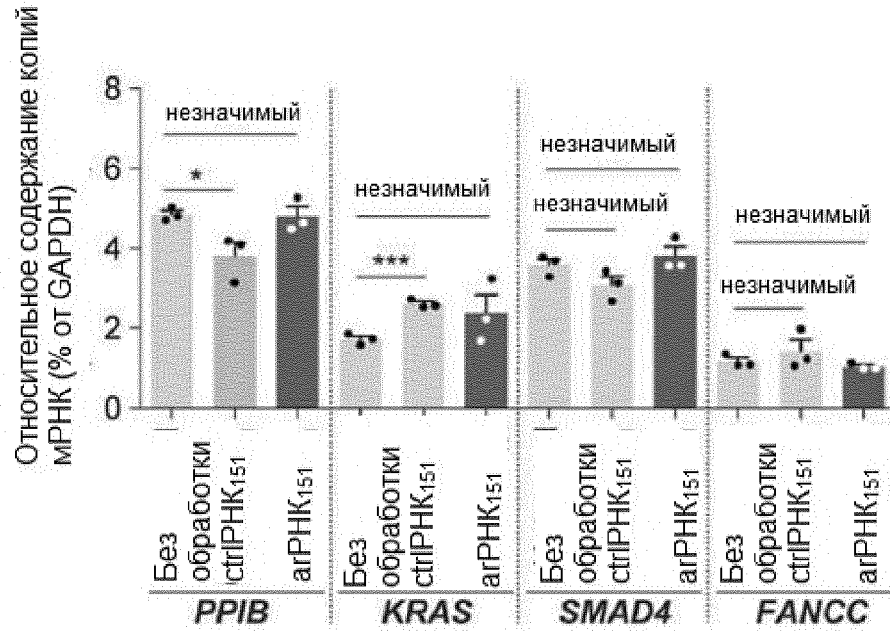


ФИГУРА 17I

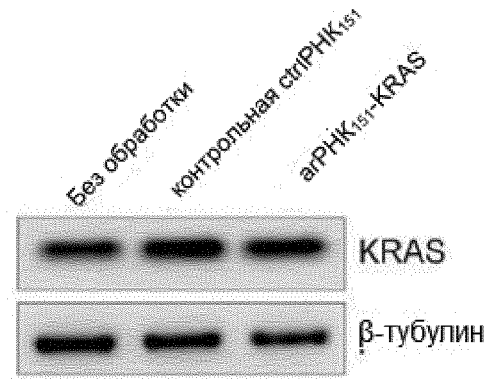
ФИГУРА 17E



ФИГУРА 17H



ФИГУРА 18А

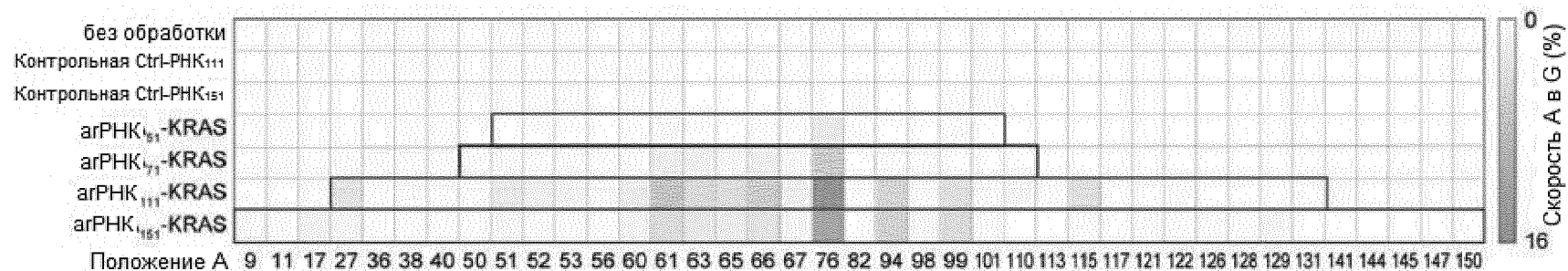


ФИГУРА 18В

Нацеливание на транскрипт KRAS

5' - GCGGGGCCAGAGGCUCAGCGGCUCCAGGUGCGGGAGAGAGGCCUGCUGAAAAUGACUGAAUAUAAACUUGUGGUAGUUGGAGCUGGUGGCCGUAAGGCAAGAGUGCCUU
 110 113 115 117 121/122 126 128/129 132 141 144/145 147 150
 GACGAUACAGCUAAUUCAGAAUCAUUUUUGUGGACGAAUAUGAU-3'

ФИГУРА 19А

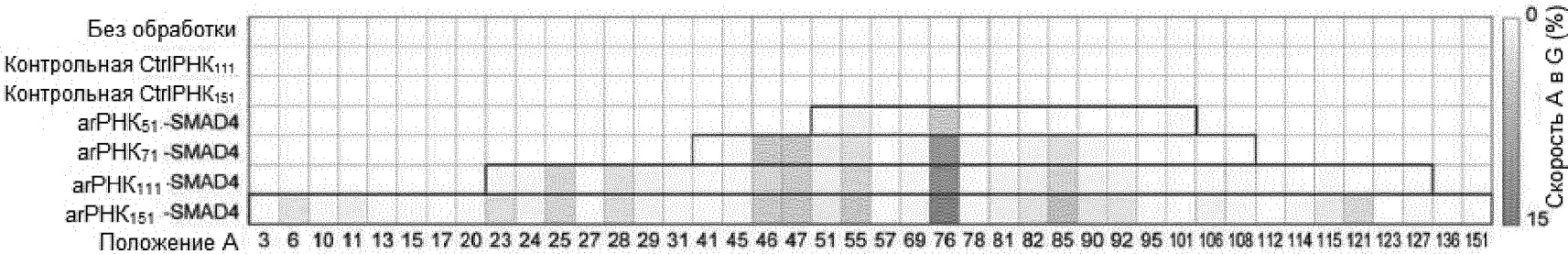


ФИГУРА 19В

Нацеливание на транскрипт SMAD4

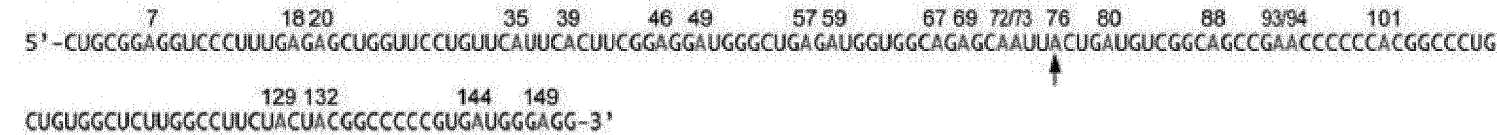
3 6 10/11 13 15 17 20 23-25 27-29 31 41 45-47 51 55-57 69 76 78 81/82 85 90 92 95 101 106 108
 5' - GGAUUACCCAAGACAGAGCAUCAAAAGAAACACCUUGCUGGAUUGAAAUUCACUACACCGGGCCCUCCAGCUCCUAGACGAAGUACUUCAUACCAUGCCGAUUGCAGAC
 112 114/115 121 123 127 136 151
 CCACAACCUUUAGACUGAGGUCUUUUACCGUUGGGGCCCUUA-3'

ФИГУРА 19С

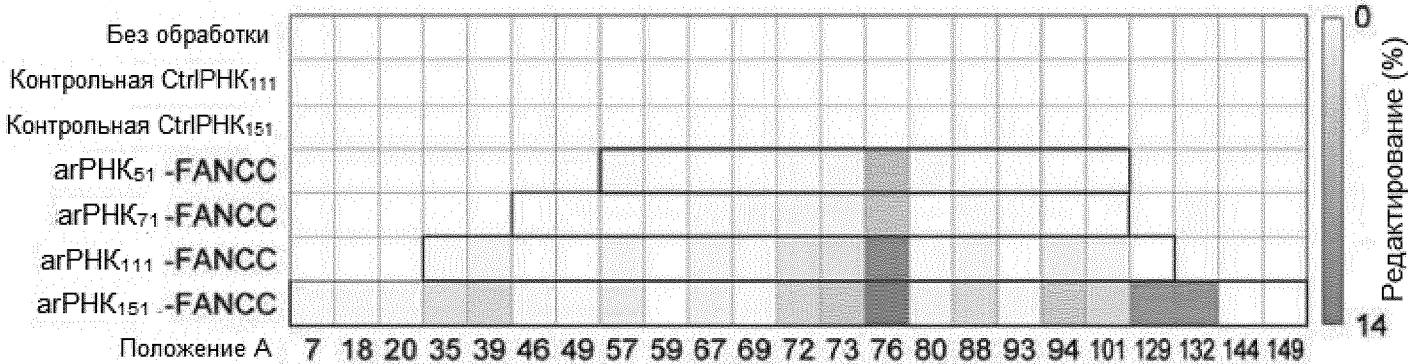


ФИГУРА 19D

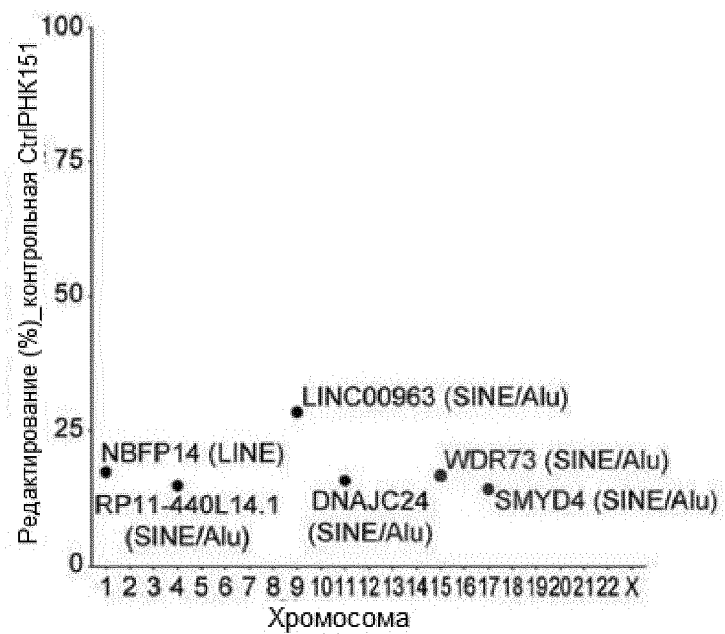
Нацеливание на транскрипт FANCC



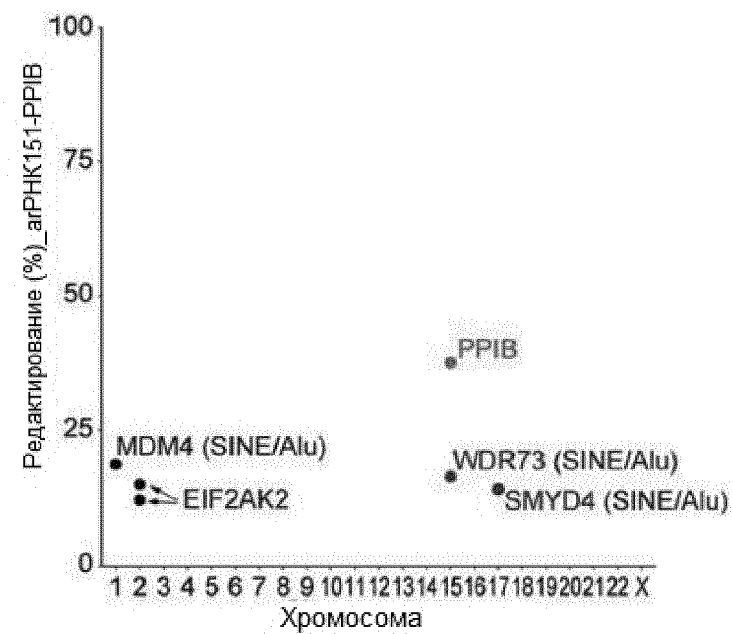
ФИГУРА 19E



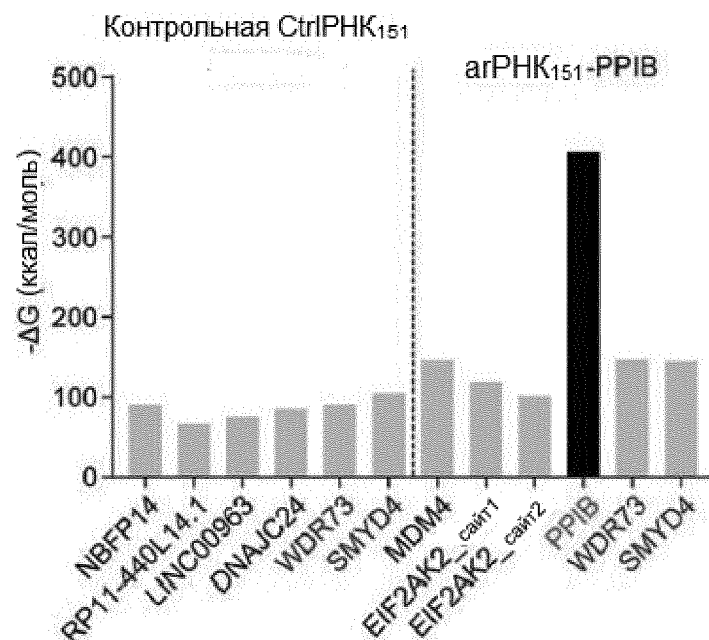
ФИГУРА 19F



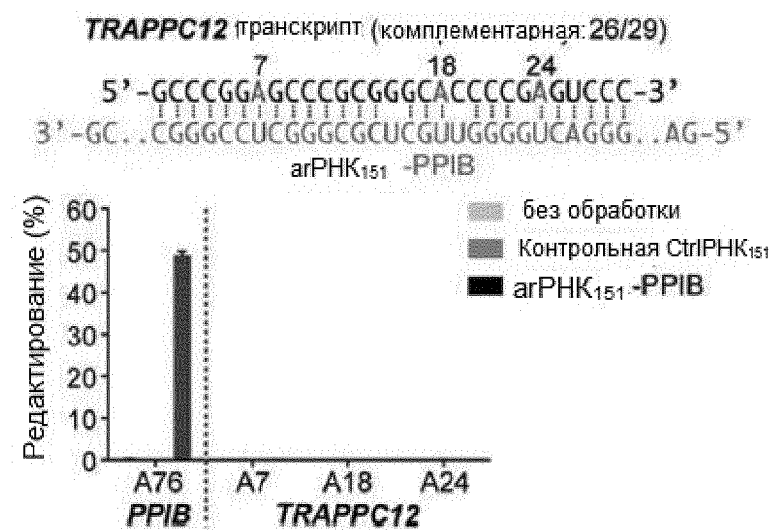
ФИГУРА 20А



ФИГУРА 20В



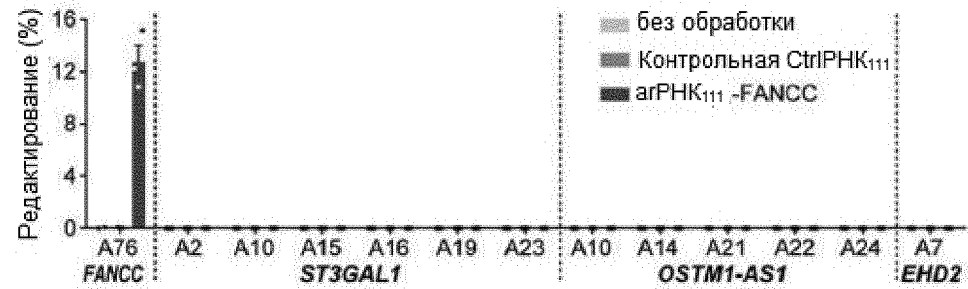
ФИГУРА 20С



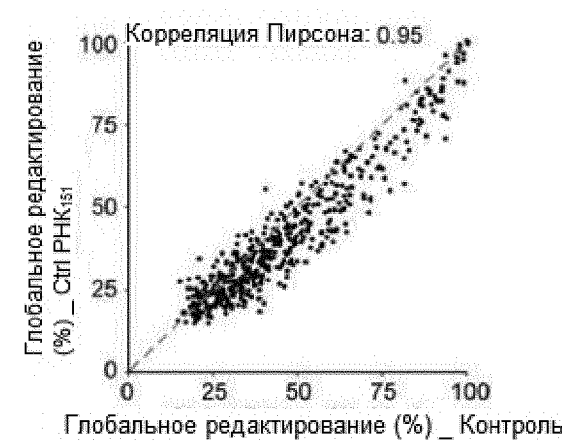
ФИГУРА 20D



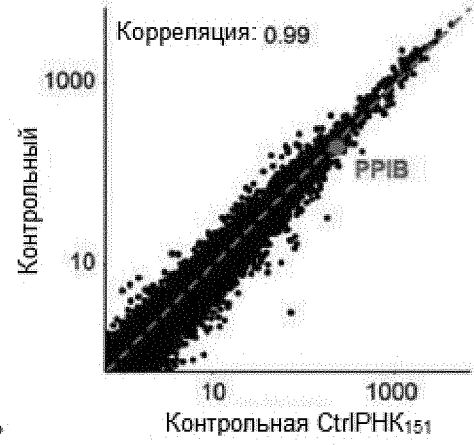
ФИГУРА 21А



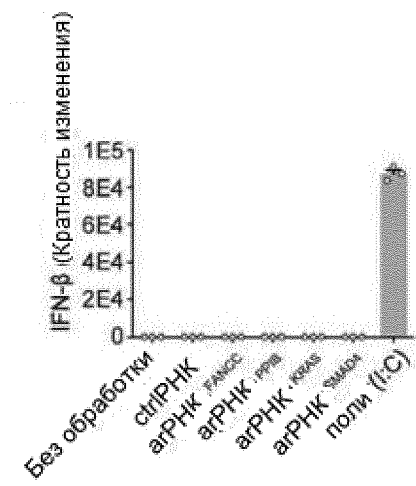
ФИГУРА 21В



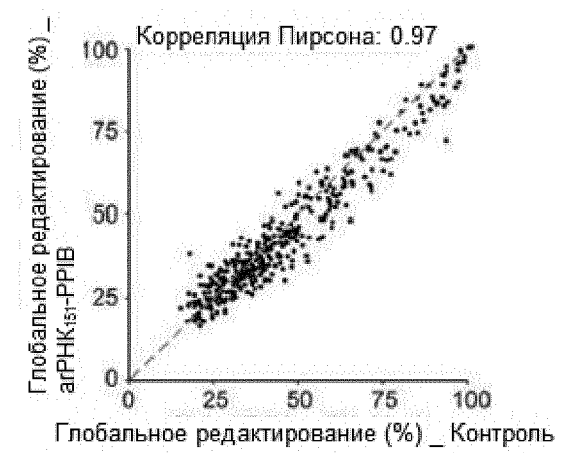
ФИГУРА 22А



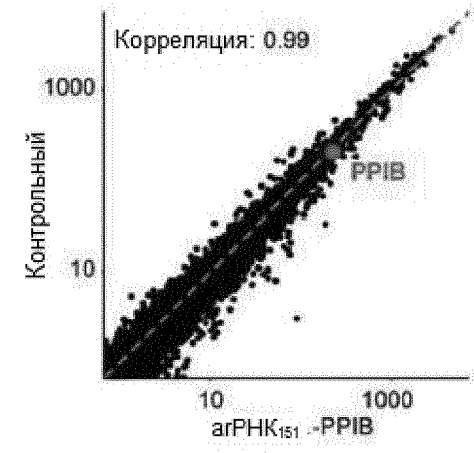
ФИГУРА 22С



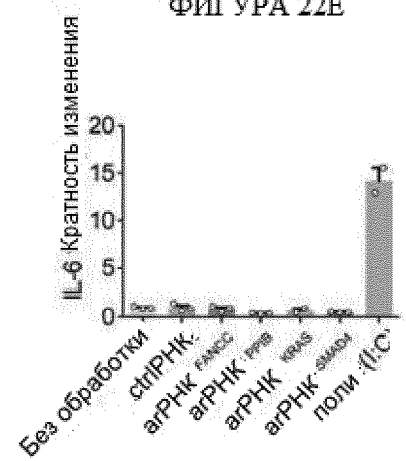
ФИГУРА 22Е



ФИГУРА 22В

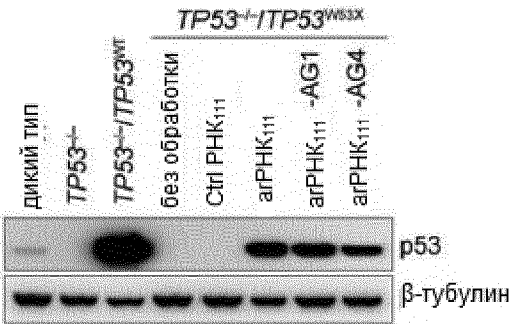
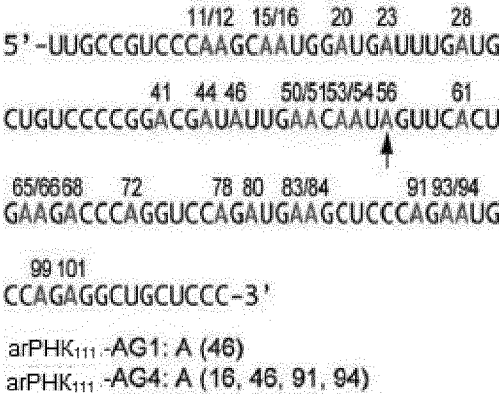


ФИГУРА 22D

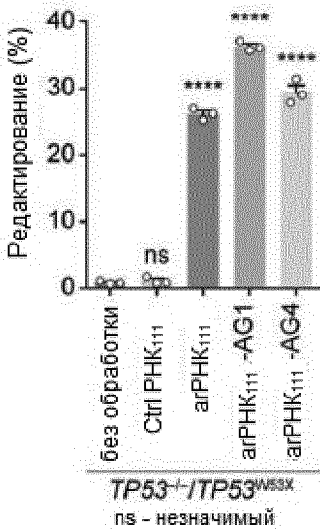


ФИГУРА 22F

Нацеливание на транскрипт TP53^{WS3X}

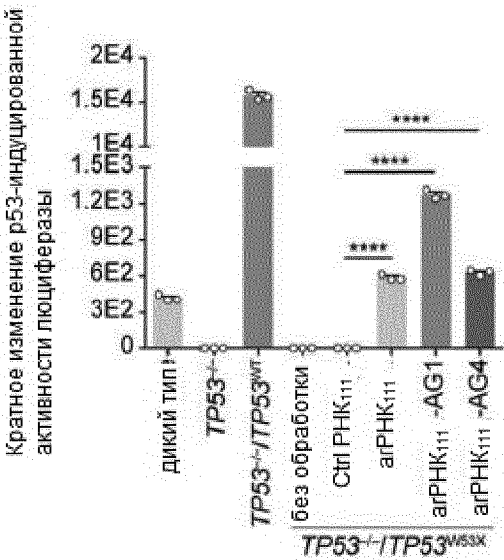


ФИГУРА 23А

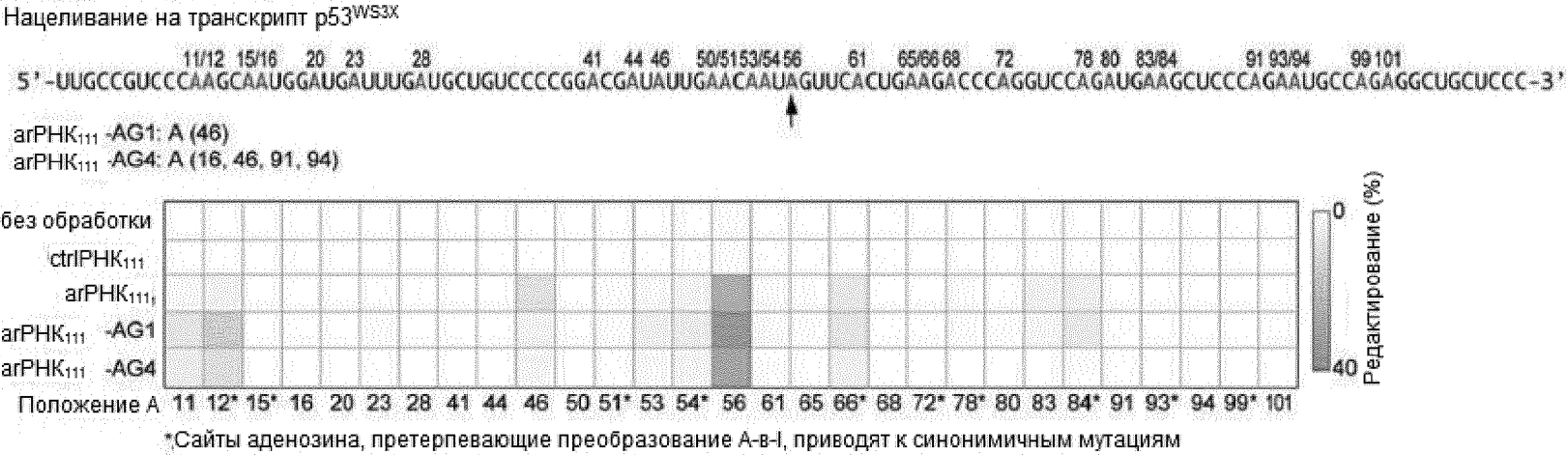


ФИГУРА 23В

ФИГУРА 23С



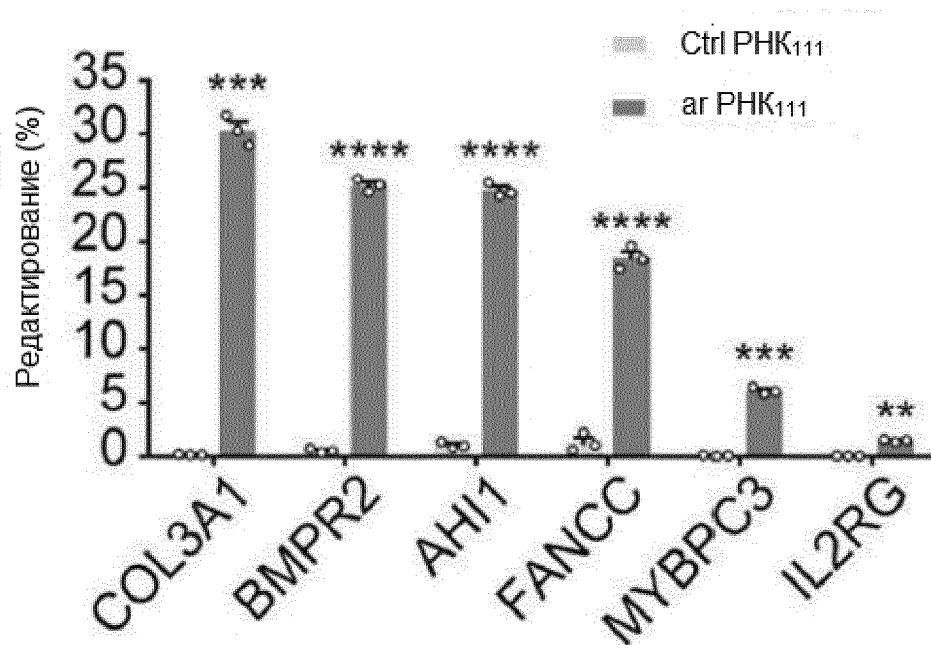
ФИГУРА 23D



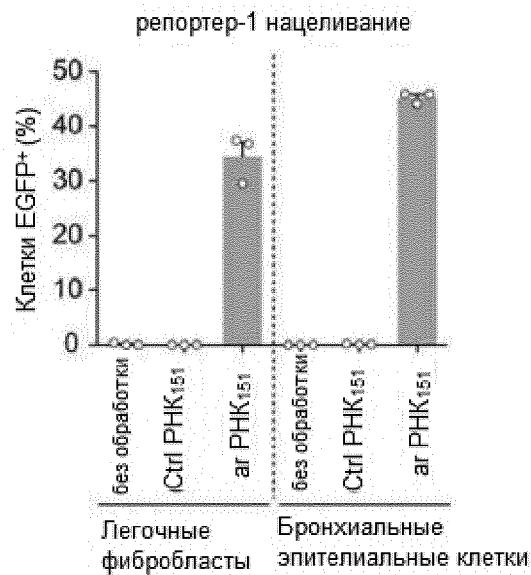
ФИГУРА 24



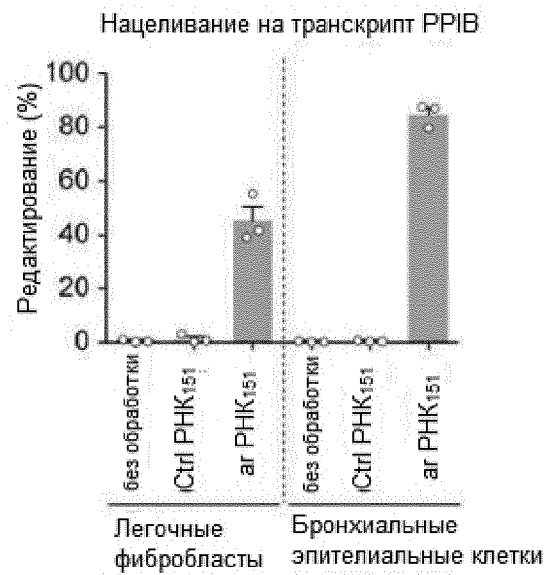
ФИГУРА 25



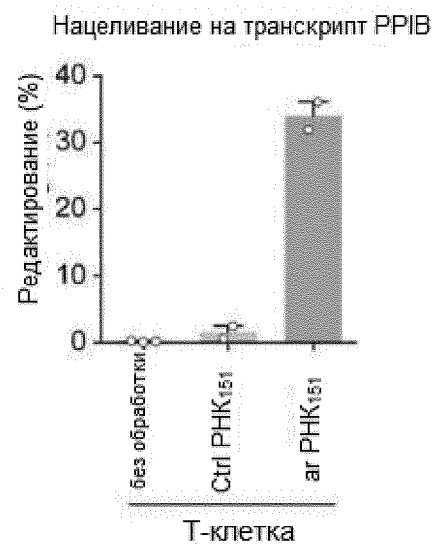
ФИГУРА 26



ФИГУРА 27А

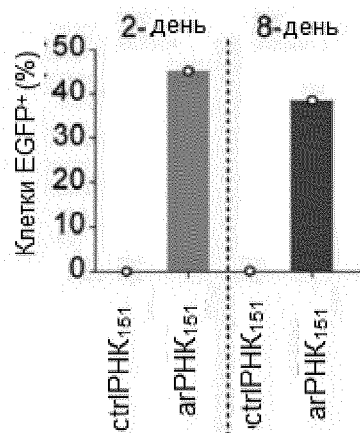


ФИГУРА 27В



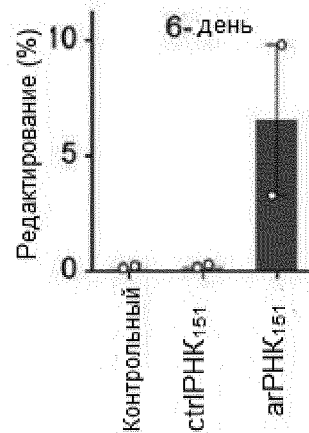
ФИГУРА 27С

Лентивирусная трансдукция
Репортер-1 нацеливание в НЕК293Т



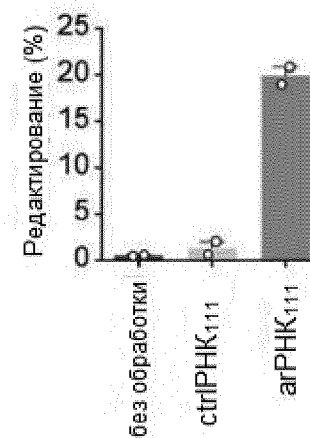
ФИГУРА 28А

Лентивирусная трансдукция
PPIB нацеливание в НЕК293Т



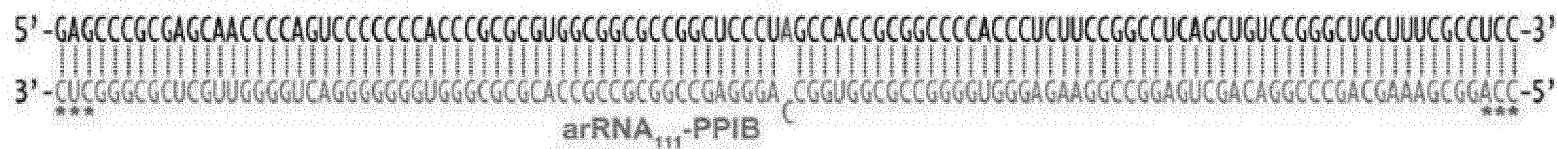
ФИГУРА 28В

Электропорация синтетических олигонуклеотидов
PPIB нацеливание в Т-клетки человека



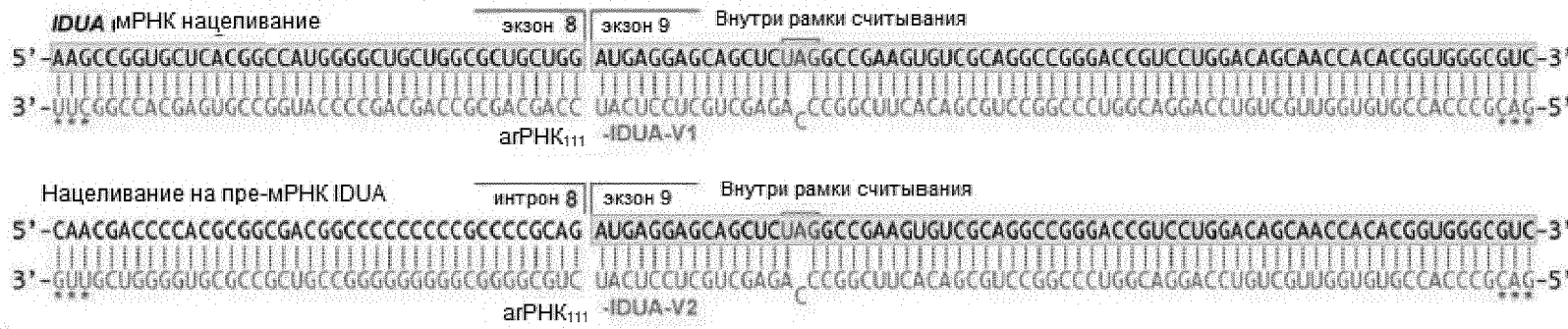
ФИГУРА 28D

Нацеливание на транскрипт *PPIB*

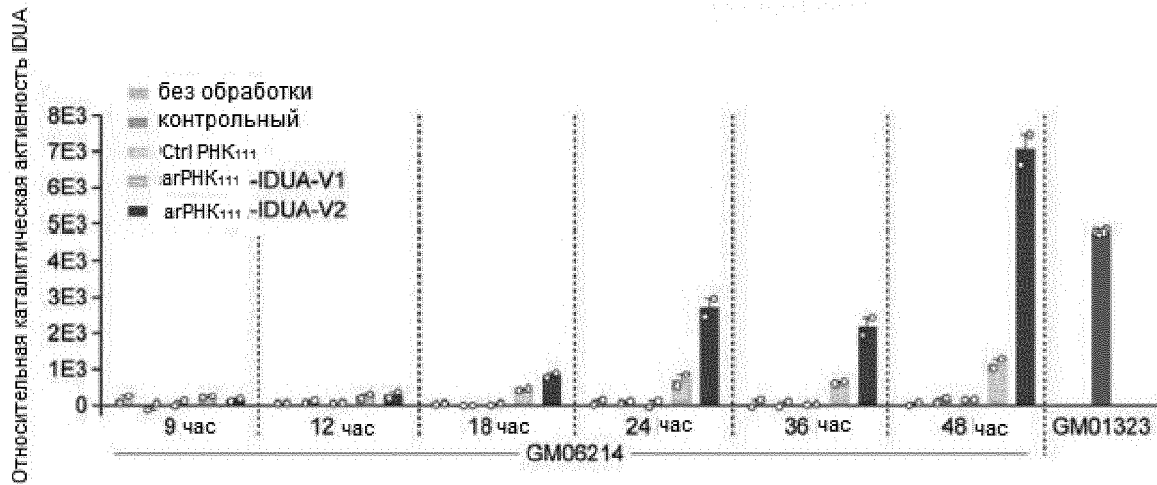


ФИГУРА 28С

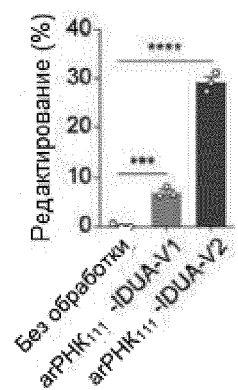
Фибробласт GM06214 (полученный от пациента с синдромом Гурлера; мутация TGG>TAG₁ в экзоне 9, приводящая к преждевременному стоп-кодону на гене IDUA)



ФИГУРА 29А

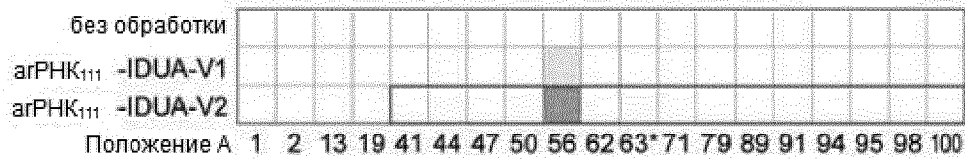
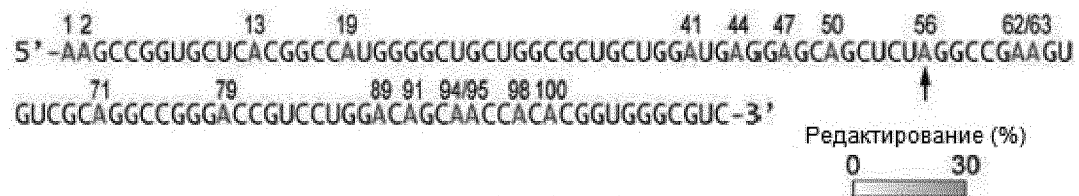


ФИГУРА 29В



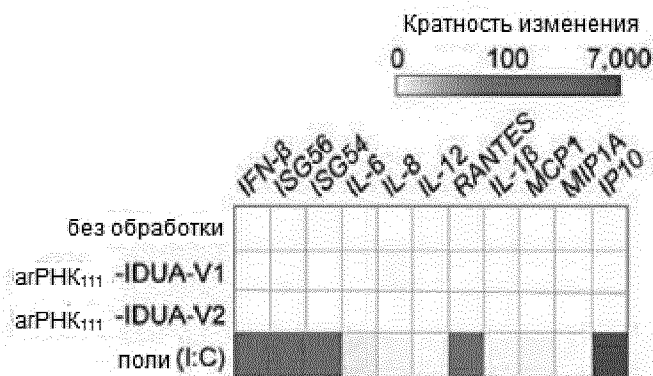
ФИГУРА 29С

Последовательность мРНК IDUA, подвергаемая редактированию



*Сайты аденозина, претерпевающие преобразование А-в-І, приводят к синонимичным мутациям

ФИГУРА 29D



ФИГУРА 29Е

репортер-1

5'    eGFP 3'

5'-
 ATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGGATAACATGGCCATCATCAAGGAGTTTCATGCGCTTCAAGGTGCA
 CATGGAGGGCTCCGTGAACGGCCACGAGTTTCGAGATCGAGGGCGAGGGCGAGGGCCGCCCTAC
 GAGGGCACCCAGACCGCCAAGCTGAAGGTGACCAAGGGTGGCCCCCTGCCCTTCGCCTGGGACAT
 CCTGTCCCTCAGTTTCATGTACGGCTCCAAGGCCTACGTGAAGCACCCCGCCGACATCCCCGACTA
 CTTGAAGCTGTCTTCCCGAGGGCTTCAAGTGGGAGCGCGTGATGAACTTCGAGGACGGCGGGCG
 TGGTGACCGTGACCCAGGACTCCTCCCTGCAGGACGGCGAGTTTCATCTACAAGGTGAAGCTGCGC
 GGCACCAACTTCCCTCCGACGGCCCCGTAATGCAGAAGAAGACCATGGGCTGGGAGGCCTCCTC
 CGAGCGGATGTACCCCGAGGACGGCGCCCTGAAGGGCGAGATCAAGCAGAGGCTGAAGCTGAAG
 GACGGCGGCCACTACGACGCTGAGGTCAAGACCACCTACAAGGCCAAGAAGCCCGTGCAGCTGCC
 CGGCGCTACAACGTCAACATCAAGTTGGACATCACCTCCCACAACGAGGACTACACCATCGTGGA
 ACAGTACGAACGGCGCGAGGGCCGCCACTCCACCGCGGCATGGACGAGCTGTACAAG CTGCA
 GGGCGAGGAGGCAGC GGGCGAGGAGGCAGC GGGCGAGGAGGCAGC
 GCCTGCTCGCGATGCTAGAGGGCTCTGCCA
 GTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTCACCGGGTGGTGCCCATCCTGGTGGAGCTGGACGGCGACGTAAAC
 GGCCACAAGTTTCAGCTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCTGAAGTTC
 ATCTGCACCACCGCAAGCTGCCGTGCCCTGGCCACCCCTGTGACCACCTGACCTACGGCGTGCACT
 GCTTCAGCCGCTACCCCGACCATGAAGCAGCAGCACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTACGT
 CCAGGACCGCACTCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCCGCCGAGGTGAAGTTCCGAGGG
 CGACACCTTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCA
 CAAGCTGGAGTACAATACAACAGCCACAACGTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAGAAGAACGGCATCAA
 GGTGAACCTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACAGCAGAA
 CACCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCCGACAACCACTACCTGAGCAGCCAGTCCGCCCCGAGC
 AAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCATGCTCCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCCGGGATCACTCTC
 GGCATGGACGAGCTGTACAAGTAA-3'

ФИГУРА 30А

репортер-2

5'    eGFP 3'

5'-
 ATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGGATAACATGGCCATCATCAAGGAGTTTCATGCGCTTCAAGGTGCA
 CATGGAGGGCTCCGTGAACGGCCACGAGTTTCGAGATCGAGGGCGAGGGCGAGGGCCGCCCTAC
 GAGGGCACCCAGACCGCCAAGCTGAAGGTGACCAAGGGTGGCCCCCTGCCCTTCGCCTGGGACAT
 CCTGTCCCTCAGTTTCATGTACGGCTCCAAGGCCTACGTGAAGCACCCCGCCGACATCCCCGACTA
 CTTGAAGCTGTCTTCCCGAGGGCTTCAAGTGGGAGCGCGTGATGAACTTCGAGGACGGCGGGCG
 TGGTGACCGTGACCCAGGACTCCTCCCTGCAGGACGGCGAGTTTCATCTACAAGGTGAAGCTGCGC
 GGCACCAACTTCCCTCCGACGGCCCCGTAATGCAGAAGAAGACCATGGGCTGGGAGGCCTCCTC
 CGAGCGGATGTACCCCGAGGACGGCGCCCTGAAGGGCGAGATCAAGCAGAGGCTGAAGCTGAAG
 GACGGCGGCCACTACGACGCTGAGGTCAAGACCACCTACAAGGCCAAGAAGCCCGTGCAGCTGCC
 CGGCGCTACAACGTCAACATCAAGTTGGACATCACCTCCCACAACGAGGACTACACCATCGTGGA
 ACAGTACGAACGGCGCGAGGGCCGCCACTCCACCGCGGCATGGACGAGCTGTACAAG CTGCA
 GGGCGAGGAGGCAGC GGGCGAGGAGGCAGC GGGCGAGGAGGCAGC
 AGAAGGTATACACCGCGGAAGAATCTGTAGAGATCCCCGGTCCGCCACC
 GTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTCACCGGGTGGTGCCCATCCTGGTGGAGCTGGACGGCGACGTAAAC
 GGCCACAAGTTTCAGCTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCTGAAGTTC
 ATCTGCACCACCGCAAGCTGCCGTGCCCTGGCCACCCCTGTGACCACCTGACCTACGGCGTGCACT
 GCTTCAGCCGCTACCCCGACCATGAAGCAGCAGCACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTACGT
 CCAGGAGCGCACTCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCCGCCGAGGTGAAGTTCCGAGGG
 CGACACCTTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCA
 CAAGCTGGAGTACAATACAACAGCCACAACGTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAGAAGAACGGCATCAA
 GGTGAACCTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACAGCAGAA
 CACCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCCGACAACCACTACCTGAGCAGCCAGTCCGCCCCGAGC

ФИГУРА 30В

AAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACAATGGTCCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCCGGGATCACTCTC
GGCATGGACGAGCTGTACAAGTAA-3'

ФИГУРА 30В (продолжение)

репортер-3

5' **mCherry** линкер мишень eGFP 3'

5'-

ATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGGATAACATGGCCATCATCAAGGAGTTCATGCGCTTCAAGGTGCACATG
GAGGGCTCCGTGAACGGCCACGAGTTCGAGATCGAGGGCGAGGGCGAGGGCCGCCCTACGAGGGGAC
CCAGACCGCCAAAGCTGAAGGTGACCAAGGGTGGCCCCCTGCCCTTCGCCTGGGACATCCTGTCCCCCTCAG
TTCATGTACGGCTCCAAGGCCTACGTGAAGCACCCTGCCGACATCCCCGACTACTTGAAAGCTGTCTTCC
CCGAGGGCTTCAAGTGGGAGCGCGTGATGAACCTCGAGGACGGCGCGCGTGTTGACCGTGACCCAGGACT
CTCCCTGCAGGACGGCGAGTTCATCTACAAGGTGAAGCTGCGCGGCACCAACTTCCCTCCGACGGCCC
CGTAATGCAGAAGAAGACCATGGGCTGGGAGGCCTCCTCGAGCGGATGTACCCCGAGGACGGCGGCCCT
GAAGGGCGAGATCAAGCAGAGGGCTGAAGCTGAAGGACGGCGGCCACTACGACGCTGAGGTCAAGACCA
CCTACAAGGCCAAGAAGCCCCGTGCAGCTGCCCGGCGCCTACAACGTCAACATCAAGTTGGACATCACT
CCACAACGAGGACTACCAATCGTGGAACAGTACGAACGCGCCGAGGGCCGCCACTCCACCGGCGGCA
TGGACGAGCTGTACAAG CTGCAAG **GGCGGAGGAGGCAAG**

GCCCTGCTCCGGATGCTAGAGGGCTCTGCCA

GTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTCACCGGGTGGTGCCTATCCTGGTTCGAGCTGGACGGCGACGTAAAC
GGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGCGGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCCTGAAGTTC
ATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCTGCCCTGGCCCCACCTCTGTGACCACCTTGACCTACGGCGTGCAGT
GCTTCAGCCGCTACCCCGACCATGAAGCAGCAGCACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTACGT
CCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGGCGGAGGTGAAGTTCGAGGG
CGACACCTGTGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCTGGGGCA
CAAGCTGGAGTACAACACAGCCACAACGTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAAGCGGCATCAA
GGTGAACCTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAA
CACCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGTGCCCCGACAACCACTACCTGAGCAGCCAGTCCGCCCTGAGC
AAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCAATGGTCCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCCGGGATCACTCTC
GGCATGGACGAGCTGTACAAGTAA-3'

ФИГУРА 30С

pLenti-dCas13-ADAR1_{DD}

CMV dCas13 линкер ADAR1_{DD} PolyA

5'-ATGGTG GATTACAAGGATGACGACGATAAG

ATGAAAGTGACGAAGGTAGGAGGCATTTCGCATAAGAAGTACACGTCCGAAGGCCCGCTTAGTGAAGTCA
GAATCCGAAGAAAATCGCACAGACGAACGTCTGTCCGCGTTGCTTAATATGCGCCTTGACATGTATATCA
AGAAATCCAGCAGCACGGAAAACCAAGGAAAATCAAAAACGCATTGGGAAAATTAAAGAAAATTTCTCAA
ACAAAATGGTCTATCTTAAAGACAATACCTTGAGTTTGAAGAATGGGAAAAAGGAGAACATTGATCGTG
AGTATTCTGAGACTGACATCCTTGAGAGCGATGTCCGTGACAAGAAAAACTTCGCCGTGTTGAAAAAGAT
CTATCTGAATGAAAACGTGAACTCGGAGGAATTGGAAGTTTTCGTAACGACATTAAGAAGAACTGAA
CAAAATCAACAGCCTGAAGTACTCATTTGAAAAGAAATAAGGCGAATTATCAAAAAGATTATGAGAATAA
CATCGAGAAGGTTGAAGGTAAGTCAAAAGCGTAACATTATTTACGATTATTATCGTGAGTCAGCGAAACGT
GACGCTTATGTAAGCAATGTGAAGAAAGCCTTTGATAAGCTTTACAAGGAAGAGGACATTGCAAAACTT
GTCTTGAAGATTGAGAACCTTACGAAGTTAGAGAAATACAAGATTGCGGAGTTCTACCACGAAATTATTG
GACGTAAGAAATGACAAAGGAAAACCTTGCAAAATCATCTACGAAGAAATCCAGAATGTGAATAACATGA
AAGAGTTGATCGAGAAAGGTACCGGACATGAGTGAGTTGAAAAAGAGCCAAGTATTTACAAGTATTACT
TAGACAAAAGAAGAGTTGAACGACAAGAACATCAAAATACGCGTTTGTGATTTCTGTGGAATCGAAATGA
GTCAGTTGCTGAAGAACTACGTATATAAGCGCTTAAGTAATATCTCGAATGACAAAATTAAGCGTATCTT
TGAATACCAGAACTTGAAAAAATTGATCGAAAATAAGCTGTTAAACAAACTTGACACGTACGTCCGTAAT
TGTTGAAAAGTATAATTATTTTGAAGACGGCGGAAATTGCCACTTCAGATTTCATCGCCCGCAACCGTC
AGAAATGAAGCGTTTCTTCGCAACATCATTTGGGGTGTCTATCTGTGGCTACTTTTCTCTTCGCAACATCTT
GAAACGGAGAACGAGAATGATATTACTGGCGGTATGCGCGGCAAAACAGTTAAGAACAATAAAGGTGA
AGAGAAGTACGTGTCCGGAGAAGTTGATAAGATCTATAATGAAAATAAGAAAGAACGAGGTTAAGGAGA

ФИГУРА 31

ACTTAAAAATGTTCTATTCTGACGATTTCATATGGACAACAAGAATGAAATCGAAGATTTCCTCGCCAA
CATCGACGAGGCGATTCTTCATCGCTCACGGTATTGTCCGCTTCAACTTGGAATTAGAAGGTAAGGAT
ATCTTTGCGTTCAAGAACATTGCGCCATCCGAAATCTCAAAGAAGATGTTTCAGAATGAGATTAAACGAGA
AAAAACTGAAATTGAAGATCTTTCGTCAACTGAACTCTGCCAACGTGTCCGCTATCTCGAAAAAGTATAA
AATTCCTGAATTACCTTAAACGTACACGCTTCGAGTTTGTCAATAAAAATATCCCATTCGTCCCGTCTTTCA
CCAAATTATATTCCGCGATTGATGACCTGAAGAATAGTCTTGGGATTACTGGAAAACTCCGAAAAACAAA
CGACGACAATAAGACTAAGGAGATTATTGATGCCCAAAATCTATTGCTTAAAAACATCTATTACGGGGAG
TTCTGTAATTATTTTCATGTGCAACAATGGTAATTTCTTTGAGATTTCATAAGAAAATCATCGAATTGAACAA
GAACGATAAACGCAACTTAAAGACTGGGTTTTACAAGCTGCAAAAGTTTGAAGACATCCAGGAGAAGAT
TCCAAAGGAATACTTGGCGAATATCCAGTCCCTGTACATGATTAATGCCGGTAATCAGGACGAAGAAGA
AAAGGACACTTATATTGATTTCATTCAAAAAGATCTTCTTAAAGGGATTATGACGTATCTTGCTAATAACG
GTCTGTTAAGTCTGATTACATCGGCTCGGATGAAGAAAACAAATACGTCATTAGCAGAAAAAGAAGCAAG
AGTTTGACAAGTCTTGAAGAAGTACGAGCAGAACAAATAATATCAAGATCCCTATGAGATCAATGAATT
CCTGCGTGAGATCAAACTGGGAAACATCTTGAAGTATCTGAGCGTTTAAACATGTTTACCTTATCTTA
AAGCTTTTGAATCACAAGGAGCTGACAAATCTGAAGGGTAGTCTTGAAAAATATCAGTCTGCCAATGAAG
GAAGAAGCGTTCCTGACCAATTGGAGTTAATTAACCTGCTTAACCTTGACAACAACCGCGTGACGGAAG
ACTTCGAATTAGAGGCCGACGAGATTGGAAAAATTCTTGATTTCAATGGCAACAAGTTAAGGATAACAA
GGAAGTGAAGAAAGTTCGATACAAACAAGATCTACTTTGACGGCGAGAACAATTATCAACACCGTGCCCTTC
TACAATATTGAAGAAATATGGCATGTTAAACTTACTGGAGAAAATTGCCGACAAGGCTGGATACAAAGATCT
CGATCGAAGAGCTGAAGAAATACTCCAATAAAAAAGAATGAGATCGAGAAGAACCATAAGATCGAGGAA
AATCTGCACCGCAAAATACGCTCGTCCCGTAAAGACGAGAAGTTACAGATGAGGACTATGAAAGTTAC
AAGCAAGCTATTGAGAATATTGAGGAGTACACCCACCTTAAGAACAAAGGTAGAATTCAATGAGCTGAAT
TACTGACAGGGCTGTTGCTGCGCATTTACATCGTTTAGTCGGATATACCTCAATTTGGGAACCGGATCT
GCGCTTCCGCTTAAAGGTGAGTTCCAGAAAAACCAATACATCGAAGAGATCTTCAACTTTGAAAAATAAG
AAGAACGTGAAGTACAAGGGGGTCAGATTGTAGAGAAATACATTAATTTCTACAAGGAATTACATCAA
AATGATGAAGTTAAGATCAACAAGTACAGTTCCGCGAATATCAAGGTGTTGAAGCAAGAAAAGAAGGAC
CTTATATTGCTAATTACATCGCCGCACTTCAATTATCTTACGCGGAGATCTCACTGCTGGAAGTCT
TGAAAAATTTGCGTAAATTTGCTGTCTTACGATCGCAAACTGAAAAATGCCGTAAATGAAATCAGTAGTTGAT
ATCCTTAAGGAGTATGGTTTTGTAGCCACATTCAAAAATCGGGGGCGGACAGAAGATCGGTATTTCAGACAC
TGGAGAGCGAAAAAATCGTGCATCTTAAGAATCTTAAGAAGAAGAAGTTAATGACTGACCGCAATTCCG
AGGAACTTTGCAAAATGGTGAAGATTATGTTTGAATACAAAATGGAAGAGAAAAAGTCTGAAAAAC
GGCGCGCC A GGCGGAGGAGGCAGC GGCGGAGGAGGCAGC
CTCCTCTCTCAAGGTCCCCAGAAGCACAGCCAAAGACACTCCCTCTCACTGGCAGCACCTTCCATGACC
AGATAGCCATGCTGAGCCACCGGTGCTTCAACACTCTGACTAACAGCTTCCAGCCCTCCTTGCTCGGCCG
CAAGATTCTGGCCGCCATCATATGAAAAAAGACTCTGAGGACATGGGTGTGCTGTCAGCTTGGGAACA
GGGAATCGCTGTGTAAAAGGAGATTCTCTCAGCCTAAAAGGAGAACTGTCAATGACTGCCATGCAGAA
ATAATCTCCCGAGAGGCTTCATCAGGTTTCTCTACAGTGAGTTAATGAAATACAACCTCCAGACTGCGA
AGGATAGTATATTGAACCTGCTAAGGGAGGAGAAAAAGCTCCAATAAAAAAGACTGTGTTCATTCATC
TGTATATCAGCACTGCTCCGTGTGGAGATGGCGCCCTCTTTGACAAGTCTGCAAGCGACCGTGCTATGGA
AAGCACAGAATCCCGCCACTACCCTGTCTTCGAGAATCCCAACAAGGAAAGCTCCGCACCAAGGTGGA
GAACGGACAAGGCACAATCCCTGTGGAATCCAGTGACATTTGTCCCTACGTGGGATGGCATTGCGCTCGG
GGAGAGACTCCGTACCATGTCTGTAGTGACAAAACTACGCTGGAACGTGCTGGGCCTGCAAGGGGC
ACTGTTGACCCACTTCTGACGCCATTTATCTCAAAATCTGTACATTTGGGTACCTTTTCAGCCAAAGGGC
ATCTGACCCGTGCTATTGCTGTCTGTGACAAGAGATGGGAGTGATTTGAGGATGGACTACGACATCC
CTTTATTGTCAACCACCCCAAGGTTGGCAGAGTCAGCATATATGATTCCAAAAGGCAATCCGGGAAGACT
AAGGAGACAAGCGTCAACTGGTGTCTGGCTGATGGCTATGACCTGGAGATCCTGGACGGTACCAGAGGC
ACTGTGGATGGGCCACGGAATGAATTGTCCCGGTCTCCAAAAAGAACATTTTCTTCTATTTAAGAAGC
TCTGCTCTTCCGTTACCGCAGGGATCTACTGAGACTCTCCTATGGTGAGGCCAAGAAAGCTGCCCGTGA
CTACGAGACGGCCAAAGAACTACTTCAAAAAAGGCCTGAAGGATATGGGCTATGGGAACTGGATTAGCAA
ACCCAGGAGGAAAAAGAACTTTATCTCTGCCAGTATAG-3'(SEQ ID NO:341)

ФИГУРА 31(продолжение)

pLenti-MCS-mCherry каркас

[illegible]

ФИГУРА 32

pLenti-arRNA-BFP картасы

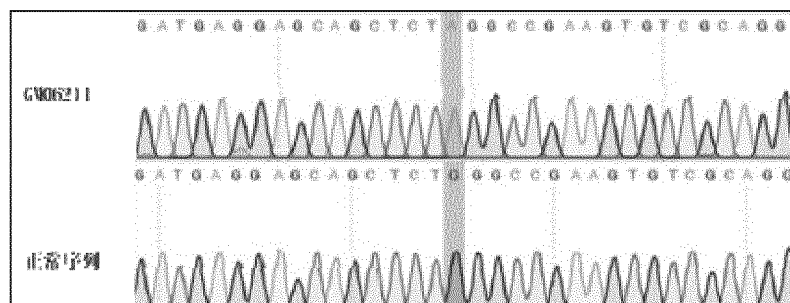


5' gaggggcctatttcccatgattccttcataattgcataacgatacaaggcgtgttagagagataattgaatttaatttgactgtaaaca
caaagatattagtacaaaatacgtgacgtgaaagtaataattcttgggtagtgttcagttttaaaitatgttttaaaatggactatca
tatgctaccgttaactgaaagtatttcgaattcttggccttataatctgttgaaaggacgaaacaccgagagacgtgcttgc
aaattaatacgaactcactatagggagaccacagctgcctagttaaagctatcaacaagtttgtacaaaaaagctgaacgagaacg

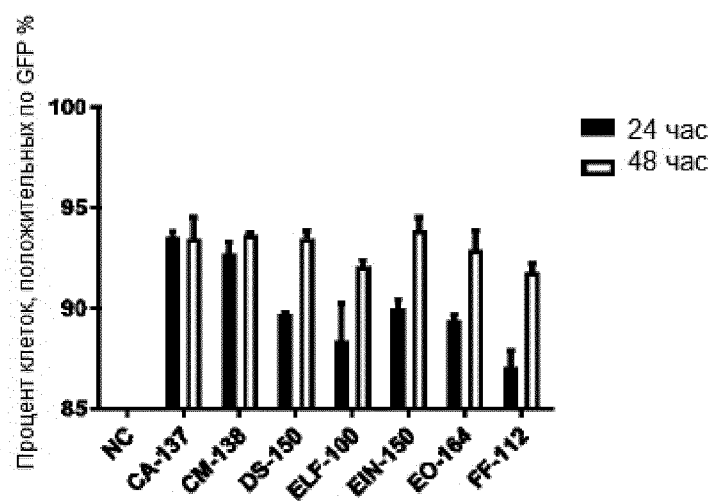
ФИГУРА 33

taaaatgatataaatatcaatatattaaattagattttgcataaaaaacagactacataatactgtaaaacacaacatatccagtcacta
tgaatcaactacttagatgggtattagtacctgtatgcgaccgacagccctccaatgttctcgggtgatgctgccaacttagtga
ccgacagccctccaatgttctcfaaacggaaatgctgtatccagccactcgtattgtctcaatgccgtattataatcataaaa
agaaataagaaaaagagggtgcgagccctcttttgggtgacaaaaataaaacatctaccctattcatatacgtagtgtcatagtcctg
aaaatcatctgcatcaagaacaatttcacaactcttatacttttcttacaagtcgttcgggtcactgtgattttcagccctatactia
ctaaacgtgataaagtttctgtaattctactgtatcgacctgcagactggctgtgtataaggaggccgtgacattttatfccccaga
acatcagggttaatggcggtttgatgtcatfcttcgggtggctgagatcagccactcttccccgataacgggagaccggcac
actggccatatcggtgggtcatcatgcccagcttcatccccgatatgcaccaccgggtaaagttcacgggagactttatc
tgacagcagacgtgacgtggccagggggacacatccgtgcgccggcggtgcaataatatactctgtacatccaca
aacagacgataacggctctctctttatagggtgtaaaccttaaacgtcatttcaccagccctgttctgcagcaaaagagc
cggtcatttcaataaaccggcgacctcagccatccctctgatttccgttccagcgttcggcacgcagacgacgggctcat
tctgcatggtgtgcttaccagaccggagatattgacatcatatatgcttgagcactgatatgctgctgtcaactgtcactgta
atacgtctctcatagcatacctcttttgacatacttcgggtatacatatcagatatattcttataaccgcaaaaacagcgcgcaaat
acgcatactgttatctggcttttagtaagccggatccacgcggcggttacgccccccctgccactcagcagactgtgttaattca
ttaagcattctgcccacatggaagccatcacaaacggcatgatgaacctgaatgccagcggcatcagcactgtcgccttgc
gtataatatttccccatggtgaaacggggcggaagaagtgtgcataattggccacgtttaaataaaaactggtgaaactaccca
gggattggctgagacgaaaaacataattcctaataaaccttttagggaaataggccagggtttaccgtaacacgccacatcttgcg
aataatattgtgataaactgccggaaatgctgtgttatcactccagagcgtgaaacgttgcattgtctcatgaaacagggtg
aacaagggtgaacactatcccatatcaccagctcaccgtcttcatgcccatacggaaattccggatgagcattcatcaggcgggc
aagaatgtgaataaaggccggataaaactgtgcttattttttacgggtctttaaaggccgtaatatccagctgaacggctctggt
tatagggtacattgagcaactgactgaaatgctcctcaaatgttctttacgatgccattgggatatacaacgggtgtatatccagtatt
ttttctccattttgcttctctgtcctgaaaatctcgataactcaaaaaatacggccggtagtgatcttatttcattatggtgaaagt
ggaaacctcttacgtgccgatcaacgtctcattttgcgcaaaagtggccagggcttccggatcaacagggacaccaggattta
tttattctgcgaagtgtatctccgtcacaggtatttattcggcgcaaaagtgcgtcgggtgatgctgccaaacttagtcgactacaggtc
actaataccactaagtagtggattcatagtgactggatattgtgtgtttacagtattatgtagtctgtttttatgcaaaatctaattaat
atattgatattatatactttacgttctcgttcagcttctgtacaaagtgttgatctagaggggcccgccgttcgaacgtctctgat
cataatggcgccctcagggtcgacgggtatcgataagctcgttcacgagattccagcagggtcaggggacctaataactcgtat
agcatacattatacgaagtataaagggttccaagcttaagcggccgcgtggataaccgtattaccgcatgcaattgatttaaat
agtaataaattacggggctcattggtcatagcccataatggaggtccggttacataacttacggtaaatggcccgccctggtgac
cgcccaacgacccccgcccatigacgtcaataatgacgtatgttcccatagtaacgccaatagggacttccattgacgtcaatgg
gtggagattttacggtaactgcccactggcgatcatcaagtgtatcatatgccagtagcccccattgacgtcaatgacgggt
aaatggcccgccgtggcattatgccagtacatgaccttatgggacttctcacttggcagfacatctacgtattagtcacgtattac
catggtgatgcggttttggcagttacatcaatggcggtggatagcgggttactcacggggatttccaagtcacccccattgacg
tcaatgggaggtttgtttggcaccaaaataacgggacttccaaaatgtcgtacaacatccgccccattgacgcaaatggcggt
aggcggtgacgggtgggaggtctataataagcagagctggttagtgaaaccgtcagatccgctagcgccaccatgagcgagctga
ttaaggagaacatgcacatgaagctgtacatggagggcaccgtggacaaccatcacttcaagtgacatccgagggcg
aaggcaagccctacgagggcaccagacatgagaatcaagggtggtcagggcgccctctcccccttgccttcgacat
cctggctactagcttctctacggcagcaagacctcaatacaacacccagggcatecccgacttctcaagcagteett
ccctgagggcttcatatgggagagagtcaccacatacgaagacggggcggtgtgacgtacccaggacaccagcct
ccaggacggctgctcatctacaacgtcaagatcagaggggtgaacttcacatccaacggccctgtgatgcagaagaa
aacactcggtgggagggccttcacgagactctgtaccccgctgacggcggtggaaggcagaaacgacatggccct
gaagctcgtggcggggagccatctgatcgcaaacatcaagaccacatagatccaagaaacccgctaagaacctcaa
gatccctggcgtctactatgtggactacagactggaagaatcaaggaggccaacaacgagacctacgtcagcagca
cggaggtggcagtgccagatactgcgacctccctagcaaaactggggcacaacctcaattaa-3' (SEQ ID NO:343)

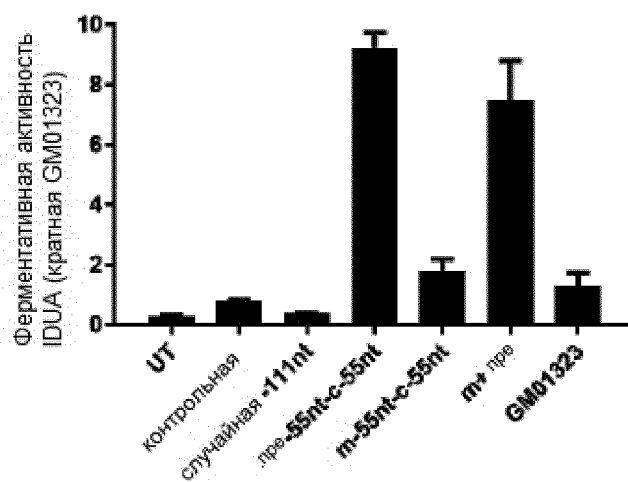
ФИГУРА 33 (продолжение)



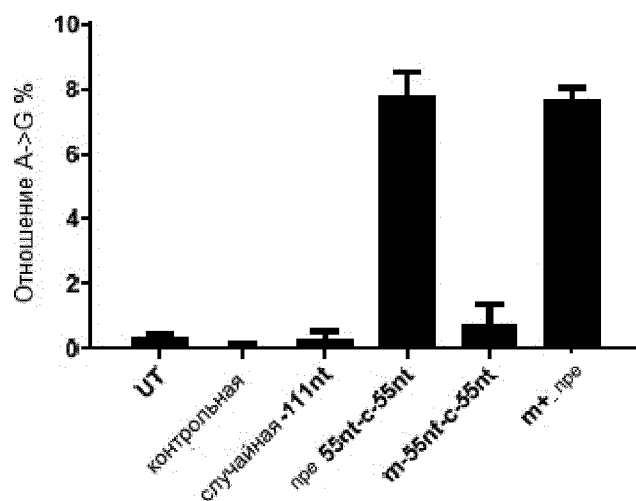
ФИГУРА 34



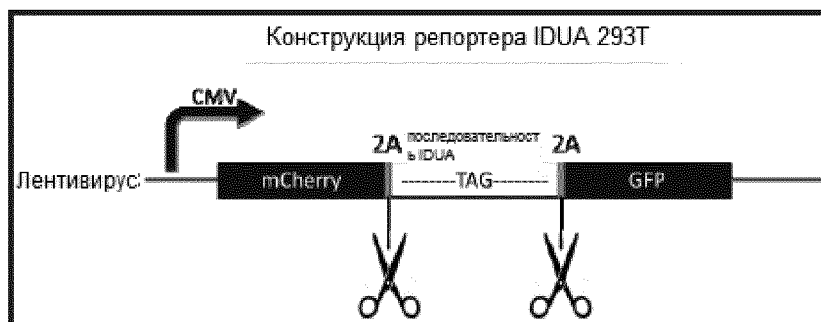
ФИГУРА 35



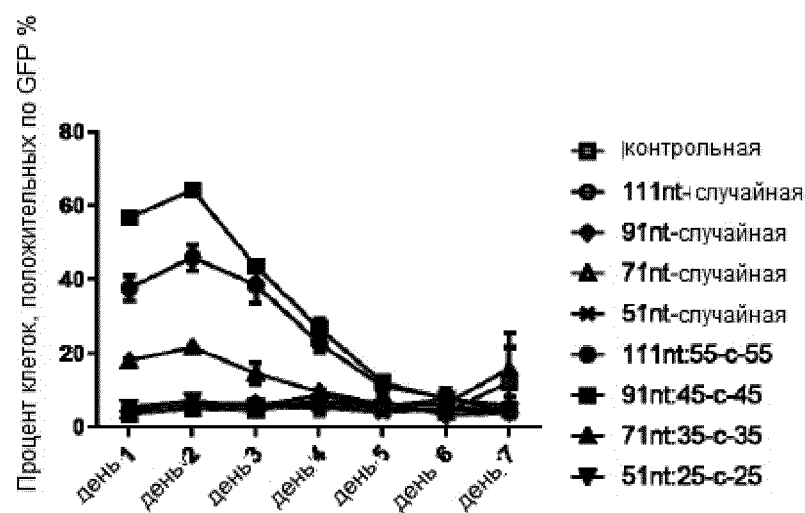
ФИГУРА 36А



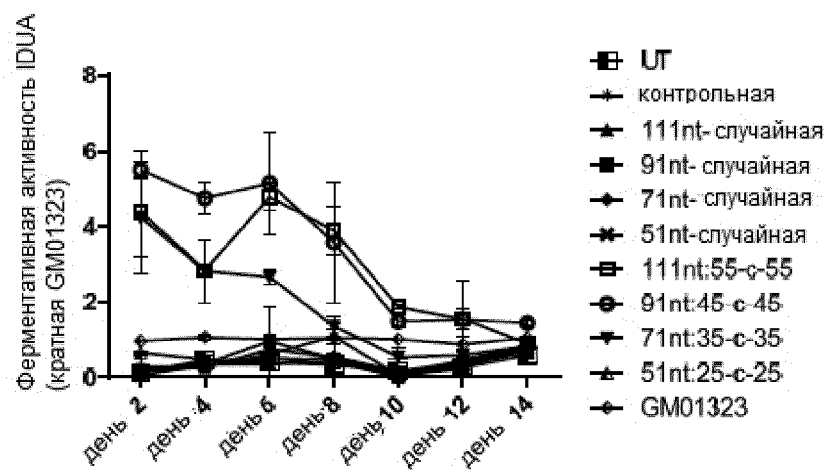
ФИГУРА 36В



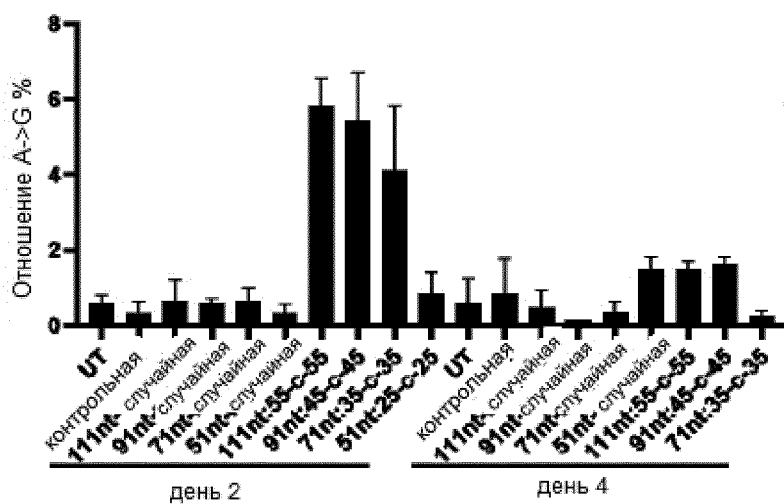
ФИГУРА 37А



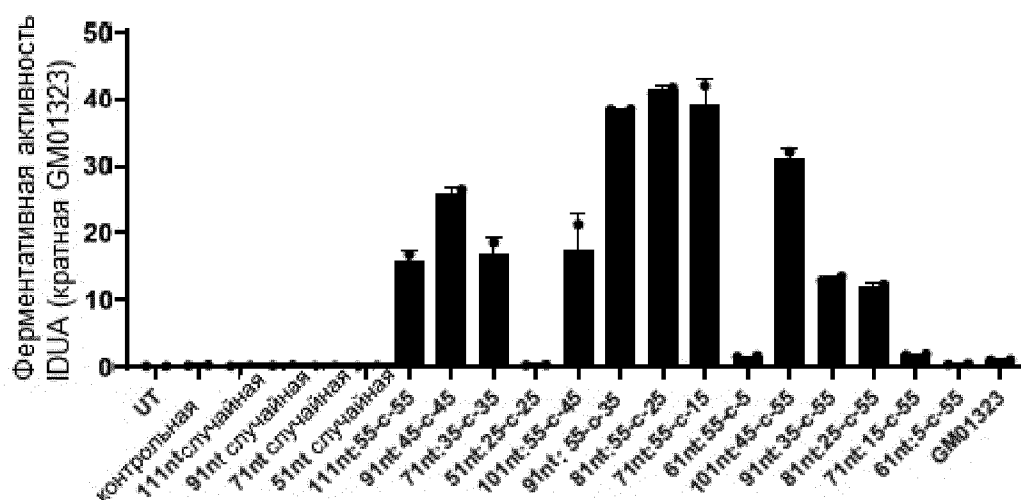
ФИГУРА 37В



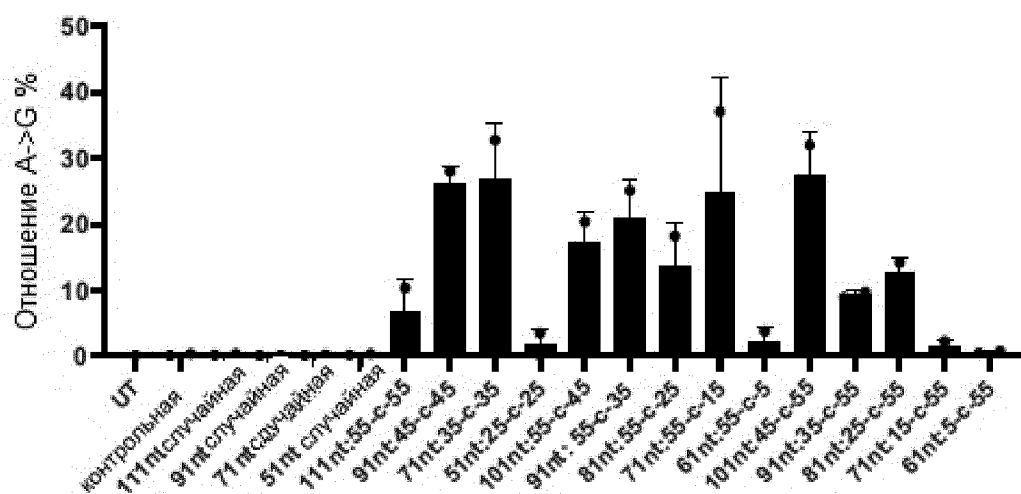
ФИГУРА 38А



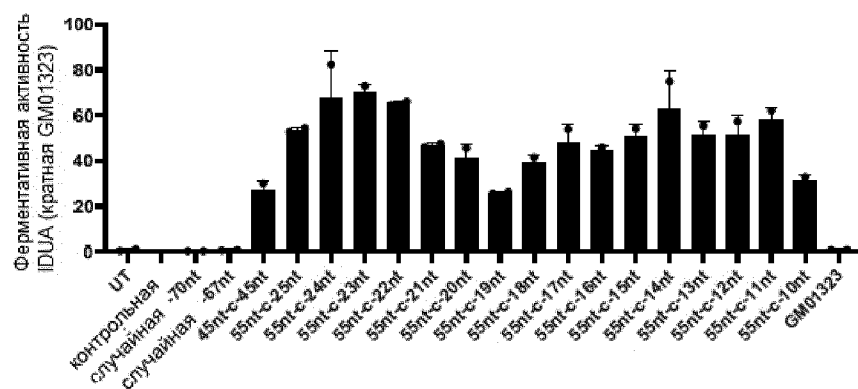
ФИГУРА 38В



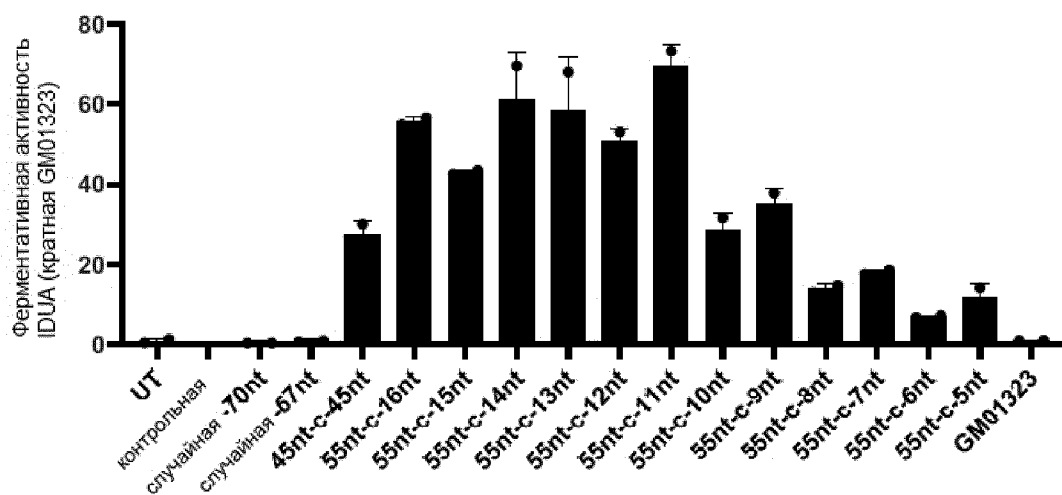
ФИГУРА 39А



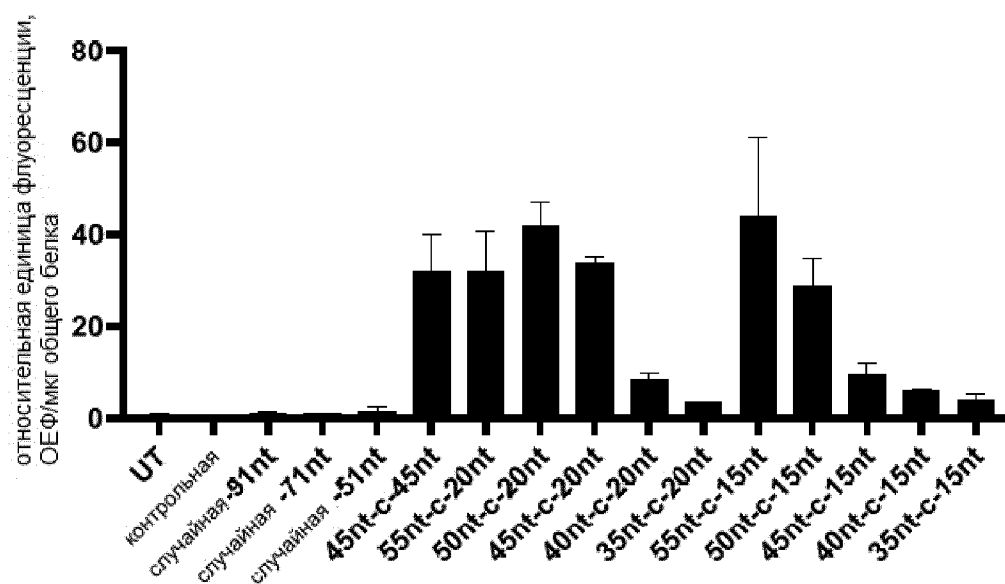
ФИГУРА 39В



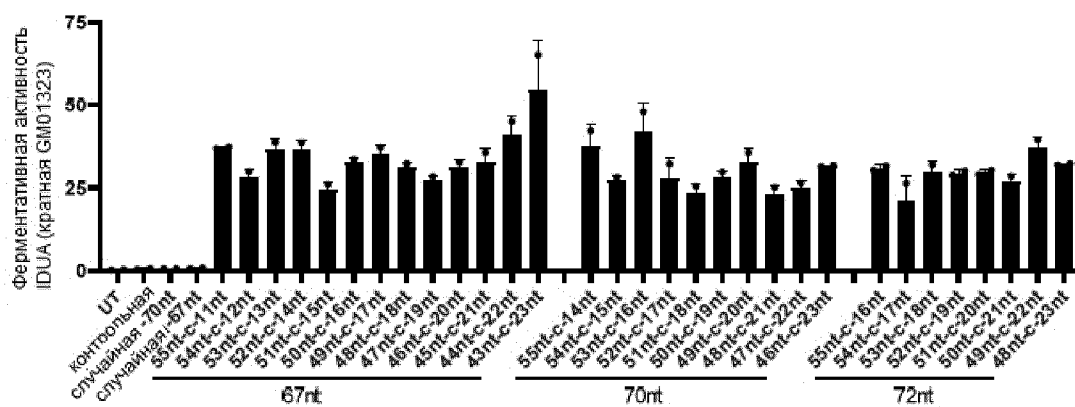
ФИГУРА 40А



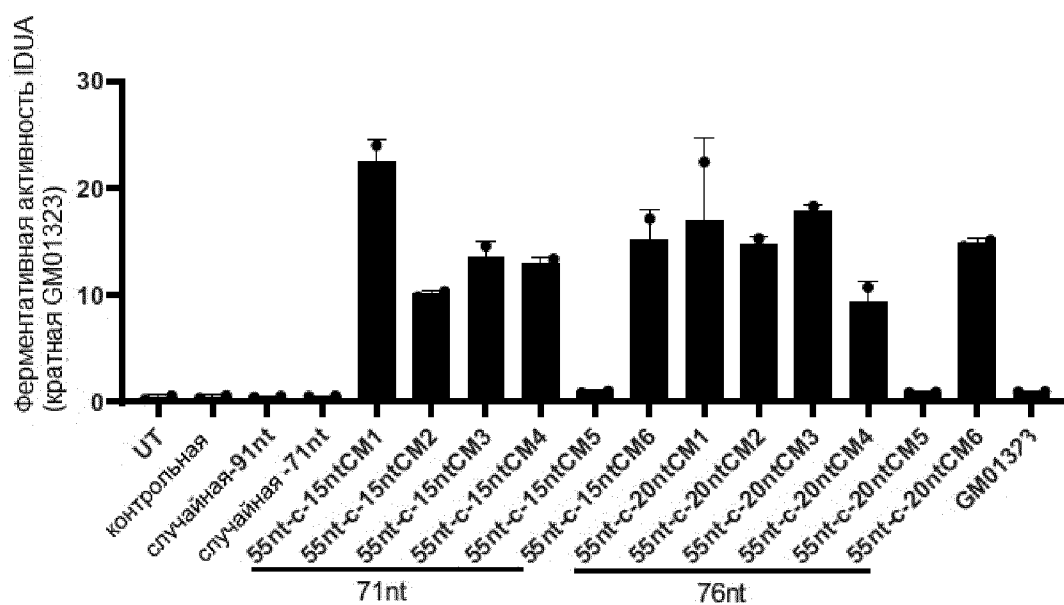
ФИГУРА 40В



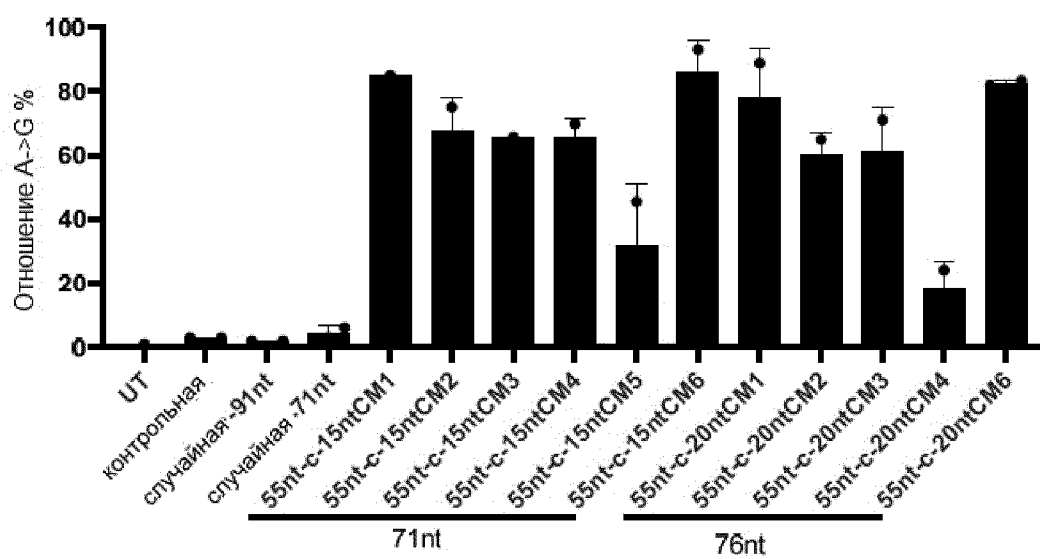
ФИГУРА 41



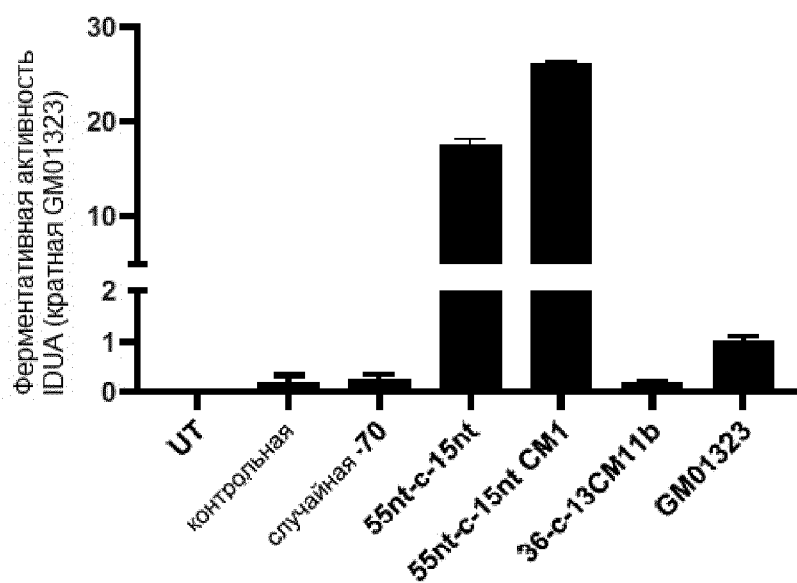
ФИГУРА 42



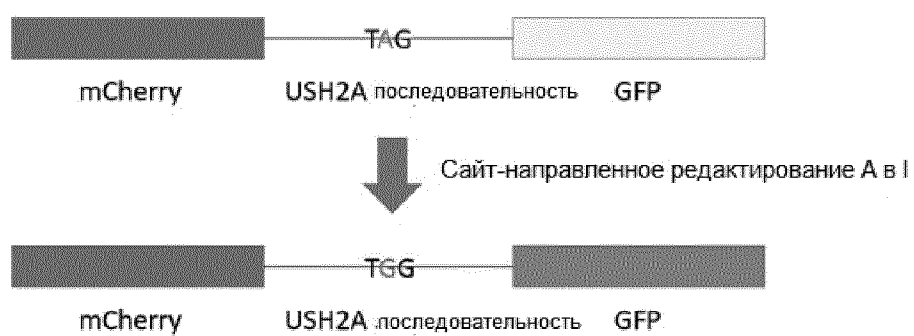
ФИГУРА 43А



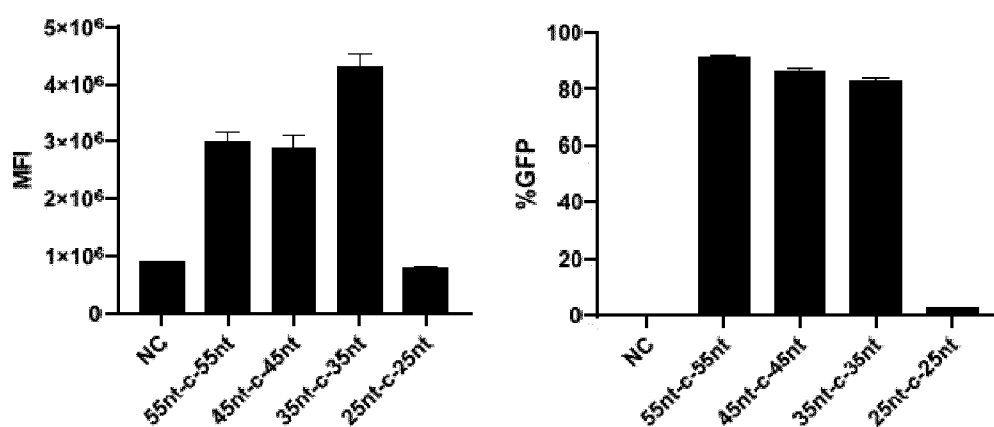
ФИГУРА 43В



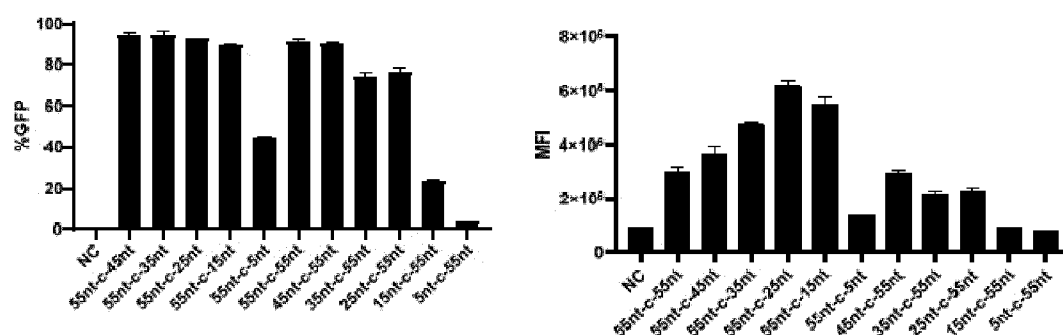
ФИГУРА 44



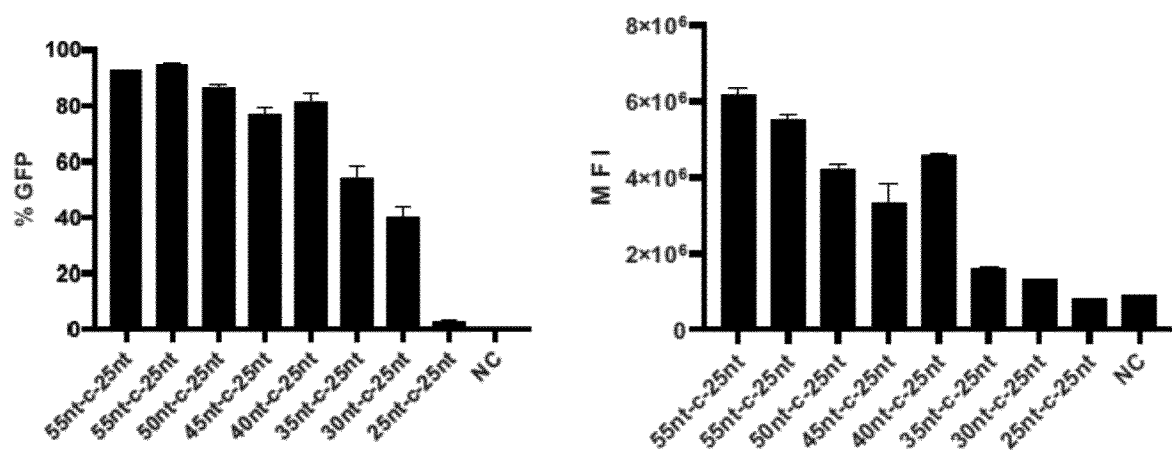
ФИГУРА 45A



ФИГУРА 45В



ФИГУРА 45С



ФИГУРА 45D