

(19)



Евразийское  
патентное  
ведомство

(21) 202290296 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки  
2022.04.15

(22) Дата подачи заявки  
2020.07.10

(51) Int. Cl. C12N 15/113 (2010.01)  
C12N 15/09 (2006.01)  
C12N 15/00 (2006.01)  
A61K 48/00 (2006.01)

(54) НАПРАВЛЕННОЕ РЕДАКТИРОВАНИЕ РНК С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ЭНДОГЕННОЙ ADAR И С ПРИМЕНЕНИЕМ СКОНСТРУИРОВАННЫХ РНК

(31) PCT/CN2019/095802

(32) 2019.07.12

(33) CN

(86) PCT/CN2020/101246

(87) WO 2021/008447 2021.01.21

(71) Заявитель:  
ПЕКИН ЮНИВЕРСИТИ (CN)

(72) Изобретатель:

Вэй Вэньшэн, И Цзунь, Цюй Лян,  
Тянь Фэн, Ван Чуньхой, Чжу Шию,  
Чжоу Чжо (CN)

(74) Представитель:

Харин А.В., Стойко Г.В., Галухина  
Д.В., Буре Н.Н., Алексеев В.В. (RU)

(57) Предложены способы редактирования РНК путем введения рекрутирующей дезаминазу РНК в клетку-хозяина для дезаминирования аденозина в целевой РНК, рекрутирующие деаминазу РНК, применяемые в способах редактирования РНК, а также содержащие их композиции и наборы.

A1

202290296

202290296

A1

## **НАПРАВЛЕННОЕ РЕДАКТИРОВАНИЕ РНК С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ЭНДОГЕННОЙ ADAR И С ПРИМЕНЕНИЕМ СКОНСТРУИРОВАННЫХ РНК**

### **ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ**

[1] Данная заявка испрашивает приоритет на основании международной патентной заявки № PCT/CN2019/095802, поданной 12 июля 2019 г., содержание которой полностью включено в настоящий документ посредством ссылки.

### **ПРЕДСТАВЛЕНИЕ ПЕРЕЧНЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ В ТЕКСТОВОМ ФАЙЛЕ ASCII**

[2] Содержание следующих материалов в текстовом файле ASCII полностью включено в настоящий документ посредством ссылки: машиночитаемая форма (CRF) Перечня последовательностей (имя файла: FD00254PCT-ST25.txt, дата записи: 10 июля 2020 г., размер: 16 Кб).

### **ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ**

[3] Настоящее изобретение в целом относится к способам и композициям для редактирования РНК с использованием сконструированной РНК, способной рекрутировать аденозиндезаминазу для дезаминирования одного или более аденозинов в целевых РНК.

### **УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ**

[4] Редактирование генома – мощный инструмент для биомедицинских исследований и разработки лекарственных средств для лечения заболеваний. Технологии редактирования с использованием сконструированных нуклеаз, таких как нуклеазы с цинковыми пальцами (ZFN), эффекторные нуклеазы, подобные активатору транскрипции (TALEN), и Cas-белки системы CRISPR (короткие палиндромные повторы, регулярно расположенные группами), применялись для внесения изменений в геном у множества организмов. В последнее время с использованием белков-дезаминаз, таких как РНК-специфическая аденозиндезаминаза (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). Каталитический субстрат белка ADAR представляет собой двухцепочечную РНК, и ADAR способен удалять группу  $-NH_2$  из азотистого основания аденозина (A), изменяя A на инозин (I). (I) распознается как гуанозин (G) и спаривается с цитидином (C) во время последующих клеточных процессов транскрипции и трансляции. Для достижения направленного редактирования РНК белок ADAR или его каталитический домен были

слиты с пептидом  $\lambda$ N, SNAP-меткой или белком Cas (dCas13b), и была разработана гидовая РНК для рекрутинга химерного белка ADAR в целевой сайт. В качестве альтернативы, сообщалось, что сверхэкспрессия белков ADAR1 или ADAR2 вместе с гидовой РНК, несущей мотив R/G, также делает возможным направленное редактирование РНК.

[5] Однако доступные в настоящее время ADAR-опосредованные технологии редактирования РНК имеют определенные ограничения. Например, наиболее эффективная доставка *in vivo* для генной терапии осуществляется с помощью вирусных векторов, но векторы на основе крайне желательного аденоассоциированного вируса (AAV) ограничены размером груза (приблизительно 4,5 т.п.н.), что делает затруднительным размещение как белка, так и гидовой РНК. Кроме того, согласно последним данным сверхэкспрессия ADAR1 придает онкогенность множественным миеломам из-за аберрантного гиперредактирования РНК, а также генерирует существенные глобальные нецелевые редактирования. Кроме того, эктопическая экспрессия белков или их доменов, имеющих происхождение, отличное от человеческого, представляет потенциальный риск проявления иммуногенности. Более того, существующий адаптивный иммунитет и ответ на повреждение ДНК, опосредованный p53, могут негативно сказаться на эффективности терапевтического белка, такого как Cas9.

#### КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[6] В настоящей заявке предложены способы редактирования РНК с применением ADAR-рекрутирующих РНК («dРНК» или «arРНК»), которые способны использовать эндогенную РНК-специфическую аденозиндезаминазу («ADAR») для редактирования РНК. В настоящем документе также предложены сконструированные dРНК или конструкции, содержащие нуклеиновую кислоту, кодирующую сконструированные dРНК, применяемые в этих способах, а также содержащие их композиции и наборы. В настоящем документе также предложены способы лечения или предупреждения заболевания или состояния у индивидуума, включающие редактирование целевой РНК, связанной с указанным заболеванием или состоянием, в клетке индивидуума.

[7] В одном из аспектов в настоящем документе предложены способы редактирования целевой РНК в клетке-хозяине, включающие введение рекрутирующей дезаминазу РНК (dРНК) или конструкции, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую dРНК, в клетку-хозяина, где:

(1) dРНК содержит нацеливающую последовательность РНК, по меньшей мере частично комплементарную целевой РНК,

(2) dРНК способна рекрутировать РНК-специфическую аденозиндезаминазу (ADAR), и

(3) dРНК представляет собой кольцевую РНК или способна образовывать кольцевую РНК.

[8] В некоторых вариантах осуществления dРНК представляет собой линейную РНК, способную образовывать кольцевую РНК. В некоторых вариантах осуществления dРНК дополнительно содержит 3'-последовательность лигирования и 5'-последовательность лигирования. В некоторых вариантах осуществления 3'-последовательность лигирования и 5'-последовательность лигирования по меньшей мере частично комплементарны друг другу. В некоторых вариантах осуществления 3'-последовательность лигирования и 5'-последовательность лигирования имеют длину от приблизительно 20 до приблизительно 75 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления dРНК циклизуют с помощью РНК-лигазы. В некоторых вариантах осуществления РНК-лигаза представляет собой РНК-лигазу RtcB. В некоторых вариантах осуществления РНК-лигаза RtcB эндогенно экспрессируется в клетке-хозяине. В некоторых вариантах осуществления dРНК представляет собой кольцевую РНК.

[9] В некоторых вариантах осуществления способ включает введение конструкции, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую dРНК, в клетку-хозяина. В некоторых вариантах осуществления конструкция дополнительно содержит 3'-последовательность рибозима twister, связанную с 3'-концом нуклеиновой кислоты, кодирующей dРНК, и 5'-последовательность рибозима twister, связанную с 5'-концом нуклеиновой кислоты, кодирующей dРНК. В некоторых вариантах осуществления 3'-последовательность twister представляет собой twister P3 U2A, и 5'-последовательность twister представляет собой twister P1. В некоторых вариантах осуществления 5'-последовательность twister представляет собой twister P3 U2A, и 3'-последовательность twister представляет собой twister P1.

[10] В еще одном аспекте в настоящем документе предложены способы редактирования целевой РНК в клетке-хозяине, включающие введение рекрутирующей дезаминазу РНК (dРНК) или конструкции, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую dРНК, в клетку-хозяина, где dРНК содержит:

(1) нацеливающую последовательность РНК, по меньшей мере частично комплементарную целевой РНК, и

(2) последовательность малой ядрышковой РНК (мякРНК), связанную с 3'- и/или 5'-концами нацеливающей последовательности РНК;

и где dРНК способна рекрутировать РНК-специфическую аденозиндезаминазу (ADAR).

[11] В некоторых вариантах осуществления dРНК содержит последовательность мякРНК, связанную с 5'-концом нацеливающей последовательности РНК («5'-последовательность мякРНК»). В некоторых вариантах осуществления dРНК содержит последовательность мякРНК, связанную с 3'-концом нацеливающей последовательности РНК («3'-последовательность мякРНК»). В некоторых вариантах осуществления последовательность мякРНК имеет длину по меньшей мере приблизительно 70 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления 3'-последовательность мякРНК содержит последовательность нуклеиновой кислоты согласно SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления 5'-последовательность мякРНК содержит последовательность нуклеиновой кислоты согласно SEQ ID NO: 2. В некоторых вариантах осуществления последовательность мякРНК представляет собой последовательность C/D-бокс-мякРНК. В некоторых вариантах осуществления последовательность мякРНК представляет собой последовательность H/ACA-бокс-мякРНК. В некоторых вариантах осуществления последовательность мякРНК представляет собой последовательность составной C/D-бокс-и H/ACA-бокс-мякРНК. В некоторых вариантах осуществления последовательность мякРНК представляет собой последовательность «сиротской» мякРНК. В некоторых вариантах осуществления способ включает введение конструкции, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую dРНК, в клетку-хозяина. В некоторых вариантах осуществления конструкция дополнительно содержит промотор, функционально связанный с нуклеиновой кислотой, кодирующей dРНК. В некоторых вариантах осуществления промотор представляет собой промотор полимеразы II («промотор Pol II»). В некоторых вариантах осуществления конструкция представляет собой вирусный вектор или плазмиду. В некоторых вариантах осуществления конструкция представляет собой вектор AAV.

[12] В еще одном аспекте в настоящем документе предложены способы редактирования целевой РНК в клетке-хозяине, включающие введение конструкции, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую рекрутирующую дезаминазу РНК (dРНК), в клетку-хозяина, где:

(1) dРНК содержит нацеливающую последовательность РНК, по меньшей мере частично комплементарную целевой РНК,

(2) dРНК способна рекрутировать РНК-специфическую аденозиндезаминазу (ADAR), и

(3) конструкция содержит промотор полимеразы II («промотор Pol II»), функционально связанный с нуклеиновой кислотой, кодирующей dРНК.

[13] В некоторых вариантах осуществления промотор pol II представляет собой промотор CMV (цитомегаловируса). В некоторых вариантах осуществления промотор CMV содержит последовательность нуклеиновой кислоты согласно SEQ ID NO: 3.

[14] Следующие варианты осуществления применимы ко всем трем аспектам, описанным выше. В некоторых вариантах осуществления конструкция представляет собой вирусный вектор или плазмиду. В некоторых вариантах осуществления конструкция представляет собой вектор AAV. В некоторых вариантах осуществления ADAR эндогенно экспрессируется клеткой-хозяином. В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин представляет собой Т-клетку. В некоторых вариантах осуществления нацеливающая последовательность РНК имеет длину более 50 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления нацеливающая последовательность РНК имеет длину от приблизительно 100 до приблизительно 180 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления нацеливающая последовательность РНК имеет длину от приблизительно 100 до приблизительно 150 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления нацеливающая последовательность РНК содержит цитидин, аденозин или уридин прямо напротив целевого аденозина в целевой РНК. В некоторых вариантах осуществления нацеливающая последовательность РНК содержит нарушающий комплементарность цитидин прямо напротив целевого аденозина в целевой РНК. В некоторых вариантах осуществления нарушающий комплементарность цитидин расположен по меньшей мере через 20 нуклеотидов от 3'-конца нацеливающей последовательности РНК и по меньшей мере через 5 нуклеотидов от 5'-конца нацеливающей последовательности РНК. В некоторых вариантах осуществления нацеливающая последовательность РНК дополнительно содержит один или более гуанозинов, каждый из которых расположен напротив нецелевого аденозина в целевой РНК. В некоторых вариантах осуществления нацеливающая последовательность РНК содержит два или более последовательных нарушающих комплементарность нуклеотидов напротив нецелевого аденозина в целевой РНК.

[15] В некоторых вариантах осуществления ближайший сосед целевого аденозина с 5'-конца в целевой РНК представляет собой нуклеотид, выбранный из U, C, A и G с предпочтением  $U > C \approx A > G$ , и ближайший сосед целевого аденозина с 3'-конца в целевой

РНК представляет собой нуклеотид, выбранный из G, C, A и U с предпочтением  $G > C > A \approx U$ . В некоторых вариантах осуществления 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. В некоторых вариантах осуществления мотив из трех оснований представляет собой UAG, и нацеливающая РНК содержит A, расположенный прямо напротив уридина в мотиве из трех оснований, цитидин, расположенный прямо напротив целевого аденозина, и цитидин, гуанозин или уридин, расположенный прямо напротив гуанозина в мотиве из трех оснований. В некоторых вариантах осуществления целевая РНК представляет собой РНК, выбранную из группы, состоящей из прематричной РНК, матричной РНК, рибосомной РНК, транспортной РНК, длинной некодирующей РНК и малой РНК. В некоторых вариантах осуществления целевая РНК представляет собой прематричную РНК.

[16] В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает введение ингибитора ADAR3 в клетку-хозяина. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает введение стимулятора интерферона в клетку-хозяина. В некоторых вариантах осуществления способ включает введение множества dРНК или конструкций, каждая из которых нацелена на отличающуюся целевую РНК. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает введение ADAR (например, экзогенной ADAR) в клетку-хозяина. В некоторых вариантах осуществления эффективность редактирования целевой РНК составляет по меньшей мере 40%. В некоторых вариантах осуществления конструкция или dРНК не вызывают иммунный ответ. В некоторых вариантах осуществления ADAR представляет собой ADAR1, содержащую мутацию E1008.

[17] В некоторых вариантах осуществления дезаминирование целевого аденозина в целевой РНК приводит к миссенс-мутации, раннему стоп-кодону, аберрантному сплайсингу или альтернативному сплайсингу в целевой РНК, или реверсии миссенс-мутации, раннего стоп-кодона, аберрантного сплайсинга или альтернативного сплайсинга в целевой РНК. В некоторых вариантах осуществления дезаминирование целевого аденозина в целевой РНК приводит к точечной мутации, усечению, удлинению и/или неправильной укладке белка, кодируемого целевой РНК, или к образованию функционального, полноразмерного, правильно уложенного белка и/или белка дикого типа посредством реверсии миссенс-мутации, раннего стоп-кодона, аберрантного сплайсинга или альтернативного сплайсинга 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 человеческую или мышиную клетку. В настоящем документе также предложены отредактированные РНК или клетки-хозяева, имеющие отредактированные РНК, полученные любым из способов, предложенных в трех вышеупомянутых аспектах.

[18] В еще одном аспекте в настоящем документе предложены способы лечения или предупреждения заболевания или состояния у индивидуума, включающие редактирование целевой РНК, связанной с указанным заболеванием или состоянием, в клетке индивидуума в соответствии с любым из способов, предложенных выше. В некоторых вариантах осуществления заболевание или состояние представляет собой наследственное генетическое заболевание, или заболевание или состояние, связанное с одной или более приобретенными генетическими мутациями. В некоторых вариантах осуществления целевая РНК имеет мутацию G в A. В некоторых вариантах осуществления заболевание или состояние представляет собой моногенное заболевание или состояние. В некоторых вариантах осуществления заболевание или состояние представляет собой полигенное заболевание или состояние.

[19] В некоторых вариантах осуществления целевая РНК представляет собой *TP53*, и заболевание или состояние представляет собой рак. В некоторых вариантах осуществления целевая РНК представляет собой *IDUA*, и заболевание или состояние представляет собой мукополисахаридоз типа I (МПС I). В некоторых вариантах осуществления целевая РНК представляет собой *COL3A1*, и заболевание или состояние представляет собой синдром Элерса-Данлоса. В некоторых вариантах осуществления целевая РНК представляет собой *BMPR2*, и заболевание или состояние представляет собой синдром Жубер. В некоторых вариантах осуществления целевая РНК представляет собой *FANCC*, и заболевание или состояние представляет собой анемию Фанкони. В некоторых вариантах осуществления целевая РНК представляет собой *MYBPC3*, и заболевание или состояние представляет собой первичную семейную гипертрофическую кардиомиопатию. В некоторых вариантах осуществления целевая РНК представляет собой *IL2RG*, и заболевание или состояние представляет собой X-сцепленный тяжелый комбинированный иммунодефицит.

[20] В еще одном аспекте настоящего документа предложены рекрутирующие дезаминазу РНК (dРНК) для редактирования целевой РНК, содержащие нацеливающую последовательность РНК, по меньшей мере частично комплементарную целевой РНК, где dРНК способна рекрутировать РНК-специфическую аденозиндезаминазу (ADAR), и где

dРНК является кольцевой или способна образовывать кольцевую РНК. В некоторых вариантах осуществления dРНК представляет собой линейную РНК, способную образовывать кольцевую РНК. В некоторых вариантах осуществления dРНК дополнительно содержит 3'-последовательность лигирования и 5'-последовательность лигирования. В некоторых вариантах осуществления 3'-последовательность лигирования и 5'-последовательность лигирования по меньшей мере частично комплементарны друг другу. В некоторых вариантах осуществления 3'-последовательность лигирования и 5'-последовательность лигирования имеют длину от приблизительно 20 до приблизительно 75 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления dРНК представляет собой кольцевую РНК. В некоторых вариантах осуществления целевая РНК представляет собой РНК, выбранную из группы, состоящей из прематричной РНК, матричной РНК, рибосомной РНК, транспортной РНК, длинной некодирующей РНК и малой РНК. Также в настоящем документе предложены конструкции, содержащие нуклеиновую кислоту, кодирующую dРНК, как описано в этом аспекте. В некоторых вариантах осуществления конструкция дополнительно содержит 3'-последовательность рибозима twister, связанную с 3'-концом нуклеиновой кислоты, кодирующей dРНК, и 5'-последовательность рибозима twister, связанную с 5'-концом нуклеиновой кислоты, кодирующей dРНК. В некоторых вариантах осуществления 3'-последовательность twister представляет собой twister P3 U2A, и 5'-последовательность twister представляет собой twister P1. В некоторых вариантах осуществления 5'-последовательность twister представляет собой twister P3 U2A, и 3'-последовательность twister представляет собой twister P1. Также в настоящем документе предложены клетки-хозяева, содержащие конструкцию или dРНК, как описано в этом аспекте. Также в настоящем документе предложены наборы для редактирования целевой РНК в клетке-хозяине, содержащие конструкцию или dРНК, как описано в этом аспекте.

[21] В еще одном аспекте в настоящем документе также предложена рекрутирующая дезаминазу РНК (dРНК) для редактирования целевой РНК, содержащая:

(1) нацеливающую последовательность РНК, по меньшей мере частично комплементарную целевой РНК, и

(2) последовательность малой ядрышковой РНК (мякРНК) на 3'- и/или 5'-концах нацеливающей последовательности РНК;

где dРНК способна рекрутировать РНК-специфическую аденозиндезаминазу (ADAR).

[22] В некоторых вариантах осуществления dРНК содержит последовательность мякРНК, связанную с 5'-концом нацеливающей последовательности РНК («5'-

последовательность мякРНК»). В некоторых вариантах осуществления dРНК содержит последовательность мякРНК, связанную с 3'-концом нацеливающей последовательности РНК («3'-последовательность мякРНК»). В некоторых вариантах осуществления последовательность мякРНК имеет длину по меньшей мере приблизительно 70 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления 3'-последовательность мякРНК содержит последовательность нуклеиновой кислоты согласно SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления 5'-последовательность мякРНК содержит последовательность нуклеиновой кислоты согласно SEQ ID NO: 2. В некоторых вариантах осуществления последовательность мякРНК представляет собой последовательность C/D-бокс-мякРНК. В некоторых вариантах осуществления последовательность мякРНК представляет собой последовательность H/АСА-бокс-мякРНК. В некоторых вариантах осуществления последовательность мякРНК представляет собой последовательность составной C/D-бокс-и H/АСА-бокс-мякРНК. В некоторых вариантах осуществления последовательность мякРНК представляет собой последовательность «сиротской» мякРНК. Также в настоящем документе предложены конструкции, содержащие нуклеиновую кислоту, кодирующую dРНК, как описано в этом аспекте. В некоторых вариантах осуществления конструкция дополнительно содержит промотор, функционально связанный с нуклеиновой кислотой, кодирующей dРНК. В некоторых вариантах осуществления промотор представляет собой промотор полимеразы II («промотор Pol II»). В некоторых вариантах осуществления целевая РНК представляет собой РНК, выбранную из группы, состоящей из прематричной РНК, матричной РНК, рибосомной РНК, транспортной РНК, длинной некодирующей РНК и малой РНК. Также в настоящем документе предложены клетки-хозяева, содержащие конструкцию или dРНК, как описано в этом аспекте. Также в настоящем документе предложены наборы для редактирования целевой РНК в клетке-хозяине, содержащие конструкцию или dРНК, как описано в этом аспекте.

[23] В еще одном аспекте в настоящем документе предложена конструкция, содержащая нуклеиновую кислоту, кодирующую рекрутирующую дезаминазу РНК (dРНК) в клетке-хозяине, где:

- (1) dРНК содержит нацеливающую последовательность РНК, по меньшей мере частично комплементарную целевой РНК,
- (2) dРНК способна рекрутировать РНК-специфическую аденозиндезаминазу (ADAR), и
- (3) конструкция содержит промотор полимеразы II («промотор Pol II»), функционально связанный с нуклеиновой кислотой, кодирующей dРНК.

[24] В некоторых вариантах осуществления промотор pol II представляет собой промотор CMV (цитомегаловируса). В некоторых вариантах осуществления промотор CMV содержит последовательность нуклеиновой кислоты согласно SEQ ID NO: 3. В некоторых вариантах осуществления конструкция представляет собой вирусный вектор или плазмиду. В некоторых вариантах осуществления конструкция представляет собой вектор AAV. В некоторых вариантах осуществления целевая РНК представляет собой РНК, выбранную из группы, состоящей из прематричной РНК, матричной РНК, рибосомной РНК, транспортной РНК, длинной некодирующей РНК и малой РНК. Также в настоящем документе предложены клетки-хозяева, содержащие конструкцию, как описано в этом аспекте. Также в настоящем документе предложены наборы для редактирования целевой РНК в клетке-хозяине, содержащие конструкцию, как описано в этом аспекте.

[25] Следует исходить из того, что одно, некоторые или все свойства различных вариантов осуществления, описанных в настоящем документе, могут быть скомбинированы с получением других вариантов осуществления настоящей заявки. Эти и другие варианты осуществления настоящей заявки дополнительно описаны в нижеследующем подробном описании изобретения.

## КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[26] На ФИГ. 1 показан анализ методом FACS после трансфекции плазмиды, экспрессирующей агРНК под контролем промотора pol II (CMV), и плазмиды, экспрессирующей агРНК под контролем промотора Pol III (U6), в течение 48 часов. Процент положительности на EGFP нормировали по эффективности трансфекции, которую определяли по соотношению положительности на mCherry. Данные представляют собой средние значения  $\pm$  СКО ( $n = 3$ ).

[27] На ФИГ. 2А-2С показано направленное редактирование РНК в отношении мРНК Репортера, опосредованное мяк-агРНК<sub>151</sub>, фланкированной концами с мякРНК. На ФИГ. 2А схематически показана плазида, экспрессирующая агРНК. 151-нуклеотидная агРНК, нацеленная на флуоресцентный Репортер-1, экспрессировалась под контролем человеческого промотора U6. На ФИГ. 2В показаны результаты FACS трансфекции мяк-агРНК или агРНК. Мяк-агРНК<sub>151</sub>, агРНК<sub>151</sub>, мяк-контр РНК<sub>151</sub> или контр РНК<sub>151</sub> трансфицировали в клетки НЕК293Т вместе с Репортер-экспрессирующими плазидами. На ФИГ. 2С показана количественная оценка результатов FACS с ФИГ. 2В.

[28] На ФИГ. 3А-3С показана эффективность редактирования с использованием мягк-агРНК, экспрессируемой под контролем промотора CMV, и мягк-агРНК, экспрессируемой под контролем промотора hU6. На ФИГ. 3А показана количественная оценка результатов FACS для мягк-агРНК или агРНК, полученных с помощью hU6, в разных временных точках. На ФИГ. 3В показана количественная оценка результатов FACS для агРНК, полученной с помощью CMV или hU6, в разных временных точках. На ФИГ. 3С показана количественная оценка результатов FACS для мягк-агРНК, полученной с помощью CMV или hU6, в разных временных точках.

[29] На ФИГ. 4А-4Е показана эффективность редактирования с использованием кольцевой агРНК в системе LEAPER. На ФИГ. 4А показана схема экспрессии кольцевой агРНК. Транскрипт кольцевой агРНК был фланкирован 5'- и 3'-последовательностями лигирования, которые были соответственно фланкированы рибозимами 5'-twister P3 U2A и 3'-twister P1, претерпевающими саморасщепление. Полученные концы РНК распознавались RtcB для лигирования. На ФИГ. 4В схематически показаны Репортер-1 и Репортер-3. Гены *mCherry* и *EGFP* были связаны последовательностями, содержащими 3× (для Репортера-1) или 1× (для Репортера-3) GGGGS-кодирующую область и внутрирамочный стоп-кодон UAG. Клетки, экспрессирующие репортер, продуцировали только белок mCherry, в то время как направленное редактирование стоп-кодона UAG транскрипта репортера позволяло превращать UAG в UIG и, таким образом, обеспечивать последующую экспрессию EGFP. На ФИГ. 4С показаны результаты эксперимента, в котором клетки НЕК293Т, стабильно экспрессирующие Репортер-1, высеянные в 12-луночные планшеты ( $3 \times 10^5$  клеток/лунку), трансфицировали 1 мкг плазмиды, экспрессирующей кольцевую агРНК<sub>71</sub>, кольцевую агРНК<sub>25-71-25</sub>, кольцевую агРНК<sub>50-71-50</sub>, кольцевую агРНК<sub>111</sub>, кольцевую агРНК<sub>25-111-25</sub>, кольцевую агРНК<sub>50-111-50</sub>, кольцевую контр РНК<sub>123</sub> (нецелевая последовательность), агРНК<sub>71</sub>, контр РНК<sub>71</sub>, агРНК<sub>111</sub>, контр РНК<sub>111</sub>, соответственно. Анализы методом FACS проводили через 2 дня и 7 дней после трансфекции. Соотношения EGFP<sup>+</sup> клеток нормировали по эффективности трансфекции. На ФИГ. 4D показаны результаты эксперимента, в котором клетки НЕК293Т, стабильно экспрессирующие Репортер-3, высеянные в 12-луночные планшеты ( $3 \times 10^5$  клеток/лунку), трансфицировали 1 мкг плазмиды, экспрессирующей контр РНК<sub>151</sub> (кольцевую), 31-, 51-, 71-, 91-, 111-, 131-, 151-нт кольцевую агРНК, соответственно. Анализы методом FACS проводили через 2 дня после трансфекции. Соотношения EGFP<sup>+</sup> клеток нормировали по эффективности трансфекции. На ФИГ. 4Е показаны результаты эксперимента, в котором клетки HeLa и A549, высеянные в 12-луночные планшеты ( $2 \times 10^5$  клеток/лунку), котрансфицировали 0,5 мкг плазмиды, экспрессирующей репортер-1, и 0,5 мкг плазмиды,

экспрессирующей кольцевую arРНК<sub>111</sub>, соответственно. Анализы методом FACS проводили через 2 дня после трансфекции. Соотношения EGFP<sup>+</sup> клеток нормировали по эффективности трансфекции.

[30] На ФИГ. 5 показан анализ методом FACS после котрансфекции различных кольцевых arРНК в течение 48 часов и 96 часов, и процент положительности на EGFP нормировали по эффективности трансфекции, которую определяли по уровню положительности на mCherry. Данные представляют собой средние значения  $\pm$  СКО ( $n = 3$ ).

[31] На ФИГ. 6А-6В показан анализ методом FACS после котрансфекции различных кольцевых arРНК в клетки НЕК293Т в течение 48 часов и 96 часов. Процент положительности на EGFP нормировали по эффективности трансфекции, которую определяли по уровню положительности на mCherry. Данные представляют собой средние значения  $\pm$  СКО ( $n = 3$ ).

[32] На ФИГ. 7 показана количественная оценка EGFP-положительных (EGFP<sup>+</sup>) клеток. Клетки, стабильно экспрессирующие Репортер-1, инфицировали различными лентивирусами с Tornado-arРНК, включая вирус с Tornado контр РНК111 и вирус с нацеливающими Tornado-arРНК различной длины, с последующим проведением FACS через 2 дня после инфицирования. Данные представляют собой средние значения  $\pm$  СОС ( $n = 2$ ).

## ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[33] В настоящем описании предложены способы редактирования РНК (называемые в настоящем документе «усовершенствованными методами LEAPER») и специально сконструированные РНК, называемые в настоящем документе рекрутирующими дезаминазу РНК («dРНК») или рекрутирующими ADAR РНК («arРНК»), или конструкции, содержащие нуклеиновые кислоты, кодирующие эти dРНК, для редактирования целевых РНК в клетке-хозяине.

[34] «LEAPER» (Leveraging Endogenous ADAR for Programmable Editing on RNA, Использование эндогенной ADAR для программируемого редактирования РНК) был ранее разработан авторами настоящей заявки, и в нем используется эндогенная ADAR для редактирования целевой РНК с использованием dРНК, также называемых «arРНК». Метод LEAPER был описан в заявках PCT/CN2018/110105 и PCT/CN2020/084922, которые полностью включены в настоящий документ посредством ссылки. В частности,

нацеливающая РНК, частично комплементарная целевому транскрипту, была применена для рекрутинга нативной ADAR1 или ADAR2 для изменения аденозина на инозин в определенном сайте в целевой РНК. Таким образом, РНК может быть достигнуто редактирование в некоторых системах без эктопической экспрессии или сверхэкспрессии белков ADAR в клетке-хозяине.

[35] В настоящей заявке предложены усовершенствованные методы LEAPER, которые позволяют повысить эффективность редактирования РНК, например, за счет увеличения уровня dРНК в клетках-мишенях. В одном из аспектов усовершенствованный метод LEAPER включает применение кольцевой dРНК или dРНК, способной образовывать кольцевую РНК. В еще одном аспекте усовершенствованный метод LEAPER включает применение dРНК, содержащей одну или более малых ядрышковых РНК (мякРНК), связанных с 3'- или 5'-концом нацеливающей последовательности РНК. В еще одном аспекте усовершенствованный метод LEAPER включает dРНК, помещенные под контроль промотора полимеразы II («промотор Pol II»). Авторы изобретения продемонстрировали, что по сравнению с методами LEAPER усовершенствованные методы LEAPER значительно повысили эффективность редактирования посредством dРНК. Не ограничиваясь какой-либо конкретной теорией, полагают, что такому повышению эффективности редактирования РНК способствовало повышение стабильности или количества dРНК, применяемой в усовершенствованных методах LEAPER.

[36] Таким образом, в настоящей заявке в одном из аспектов предложен способ редактирования целевой РНК одним или более усовершенствованными методами LEAPER.

[37] В еще одном аспекте предложены dРНК и конструкции, применяемые для усовершенствованных методов LEAPER.

[38] В настоящем документе также предложены способы и композиции для лечения или предупреждения заболевания или состояния у индивидуума с применением способов редактирования РНК.

## **I. Определения**

[39] Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в настоящем документе, имеют то же значение, которое обычно понимается специалистом в области техники, к которой относится данное изобретение. Все патенты, заявки, опубликованные заявки и другие публикации, цитируемые в настоящем документе,

полностью включены посредством ссылки. Если определение, изложенное в этом разделе, противоречит или иным образом не согласуется с определением, изложенным в патенте, заявке или другой публикации, которая включена в настоящий документ посредством ссылки, определение, изложенное в этом разделе, имеет преимущественную силу над определением, включенным в настоящий документ посредством ссылки.

[40] Следует принимать во внимание, что некоторые признаки изобретения, которые для ясности описаны в контексте отдельных вариантов осуществления, также могут быть представлены в комбинации в одном варианте осуществления. И наоборот, различные признаки изобретения, которые для краткости описаны в контексте одного варианта осуществления, также могут быть представлены по отдельности или в любой подходящей подкомбинации. Все комбинации вариантов осуществления, относящиеся к конкретным стадиям способа, реагентам или условиям, специально охватываются настоящим изобретением и раскрыты в настоящем документе точно так же, как если бы каждая комбинация была раскрыта отдельно и в явном виде.

[41] В контексте настоящего документа и прилагаемой формулы изобретения формы единственного числа включают в себя термины во множественном числе, если из контекста однозначно не следует иное. Также следует отметить, что формула изобретения может быть составлена с исключением любого необязательного элемента. Таким образом, данное заявление призвано служить основанием для использования такой исключительной терминологии, как «исключительно», «только» и т. п., применительно к перечислению элементов формулы изобретения, или использования «отрицательного» *ghbpyfrf*.

[42] Термины «*рекрутирующая дезаминазу РНК*», «*dРНК*», «*рекрутирующая ADAR РНК*» и «*arРНК*» в контексте настоящего документа используются взаимозаменяемо для обозначения сконструированной РНК, способной рекрутировать ADAR для дезаминирования целевого аденозина в РНК.

[43] Термины «*полинуклеотид*», «*нуклеотидная последовательность*» и «*нуклеиновая кислота*» используются взаимозаменяемо. Они относятся к полимерной форме нуклеотидов любой длины, представляющих собой дезоксирибонуклеотиды или рибонуклеотиды, или их аналогов.

[44] В контексте настоящего документа термины «*аденин*», «*гуанин*», «*цитозин*», «*тимин*», «*урацил*» и «*гипоксантин*» относятся к азотистым основаниям как таковым. Термины «*аденозин*», «*гуанозин*», «*цитидин*», «*тимидин*», «*уридин*» и «*инозин*» относятся к азотистым основаниям, связанным с сахарным фрагментом рибозы или дезоксирибозы.

Термин «нуклеозид» относится к азотистому основанию, связанному с рибозой или дезоксирибозой. Термин «нуклеотид» относится к соответствующему азотистому основанию-рибозилфосфату или азотистому основанию-дезоксирибозилфосфату. Иногда термины «аденозин» и «аденин» (с сокращением «А»), «гуанозин» и «гуанин» (с сокращением «G»), «цитозин» и «цитидин» (с сокращением «C»), «урацил» и «уридин» (с сокращением, «U»), «тимин» и «тимидин» (с сокращением «T»), «инозин» и «гипоксантин» (с сокращением «I») используются взаимозаменяемо для обозначения соответствующего азотистого основания, нуклеозида или нуклеотида. Иногда термины «азотистое основание», «нуклеозид» и «нуклеотид» используются взаимозаменяемо, если из контекста однозначно не следует иное.

[45] Термин «*вводить*» или «*введение*» в контексте настоящего документа означают доставку одного или более полинуклеотидов, таких как dРНК, или одной или более конструкций, включая векторы, как описано в настоящем документе, одного или более их транскриптов, в клетку-хозяина. Изобретение служит базовой платформой для обеспечения возможности направленного редактирования РНК, например, прематричной РНК, матричной РНК, рибосомной РНК, транспортной РНК, длинной некодирующей РНК и малой РНК (такой как микроРНК). В способах согласно настоящей заявке может быть использовано множество систем доставки, включая, не ограничиваясь перечисленным, вирусные, липосомы, электропорацию, микроинъекцию и конъюгацию, для достижения введения dРНК или конструкции, как описано в настоящем документе, в клетку-хозяина. Для введения нуклеиновых кислот в клетки млекопитающих или целевые ткани могут быть использованы обычные методы переноса генов на вирусной и невирусной основе. Такие методы могут быть использованы для введения нуклеиновых кислот, кодирующих dРНК согласно настоящей заявке, в клетки в культуре или в организм-хозяин. Системы доставки на основе невирусных векторов включают ДНК-плазмиды, 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 на основе вирусных векторов включают ДНК- и РНК-содержащие вирусы, которые имеют геномы либо в эписомальной, либо во встроенной форме, для доставки в клетку-хозяина.

[46] В контексте настоящей заявки «*целевая РНК*» относится к последовательности РНК, с совершенной комплементарностью или существенной комплементарностью к которой конструируют последовательность рекрутирующей дезаминазу РНК, и гибридизация между целевой последовательностью и dРНК образует область

двухцепочечной РНК (дцРНК), содержащую целевой аденозин, которая рекрутирует РНК-специфическую аденозиндезаминазу (ADAR), которая дезаминирует целевой аденозин. В некоторых вариантах осуществления ADAR естественным образом присутствует в клетке-хозяине, такой как эукариотическая клетка (такой как клетка млекопитающего, например, человеческая клетка). В некоторых вариантах осуществления ADAR вводят в клетку-хозяина.

[47] В контексте настоящего документа «*комплементарность*» относится к способности нуклеиновой кислоты образовывать водородную связь (связи) с другой нуклеиновой кислотой посредством канонического спаривания оснований по Уотсону-Крику. Процент комплементарности обозначает процент остатков в молекуле нуклеиновой кислоты, которые могут образовывать водородные связи (то есть, спаривание оснований по Уотсону-Крику) со второй нуклеиновой кислотой (например, приблизительно 5, 6, 7, 8, 9, 10 из 10, являясь приблизительно на 50%, 60%, 70%, 80%, 90% и 100% комплементарными, соответственно). «Совершенно комплементарный» означает, что все смежные остатки последовательности нуклеиновой кислоты образуют водородные связи с таким же количеством смежных остатков во второй последовательности нуклеиновой кислоты. «По существу комплементарный» в контексте настоящего документа относится к степени комплементарности, равной по меньшей мере приблизительно любой из 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% или 100%, в области из приблизительно 40, 50, 60, 70, 80, 100, 150, 200, 250 или более нуклеотидов, или относится к двум нуклеиновым кислотам, которые гибридизуются в жестких условиях.

[48] В контексте настоящего документа «*жесткие условия*» гибридизации относятся 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 Tijssen (1993), Laboratory Techniques In Biochemistry And Molecular Biology- Hybridization With Nucleic Acid Probes, часть I, вторая глава "Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid probe assay," Elsevier, N.Y.

[49] «Гибридизация» относится к реакции, в которой один или более полинуклеотидов реагируют с образованием комплекса, который стабилизирован посредством водородных связей между основаниями нуклеотидных остатков. Водородное связывание может происходить путем спаривания оснований по Уотсон-Крику, связывания по Хугстину или любым другим сиквенс-специфическим образом. Последовательность, способная гибридизоваться с данной последовательностью, называется «комплементом» данной последовательности.

[50] В контексте настоящего документа термины «*включающий*» и «*содержащий*» используются в их открытом, неограничивающем смысле. Также следует принимать во внимание, что аспекты и варианты осуществления настоящей заявки, описанные в настоящем документе, могут включать «*состоящие*» и/или «*по существу состоящие из*» аспектов и вариантов осуществления.

[51] Подразумевается, что независимо от того, используется ли термин «*приблизительно*» в явном виде или нет, каждая величина, приведенная в настоящем документе, относится к фактическому указанному значению, а также относится к величине, приближенной к такому указанному значению, которую можно разумно вывести исходя из общих знаний в данной области техники, включая эквиваленты и приближенные величины, обусловленные условиями эксперимента и/или измерения для такого указанного значения.

[52] В контексте настоящего документа «*носитель*» включает фармацевтически приемлемые носители, эксципиенты или стабилизаторы, которые нетоксичны для клетки или млекопитающего, подвергающихся их воздействию, в используемых дозировках и концентрациях. Часто физиологически приемлемый носитель представляет собой забуференный водный раствор. Неограничивающие примеры физиологически приемлемых носителей включают буферы, такие как фосфатный, цитратный, и другие органические кислоты; антиоксиданты, включая аскорбиновую кислоту; низкомолекулярный (содержащий менее приблизительно 10 остатков) полипептид; белки, такие как сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины; гидрофильные полимеры, такие как поливинилпирролидон; аминокислоты, такие как глицин, глутамин, аспарагин, аргинин или лизин; моносахариды, дисахариды и другие углеводы, включая глюкозу, маннозу или декстрины; хелатирующие агенты, такие как ЭДТА (этилендиаминтетрауксусная кислота); сахарные спирты, такие как маннит или сорбит; солеобразующие противоионы, такие как натрий; и/или неионогенные поверхностно-активные вещества, такие как TWEEN™, полиэтиленгликоль (ПЭГ) и PLURONICS™.

[53] В контексте настоящего документа термин *«эффективное количество»* или *«терапевтически эффективное количество»* вещества представляет собой по меньшей мере минимальную концентрацию, необходимую для достижения измеримого улучшения или предупреждения определенного расстройства. Эффективное количество в настоящем документе может варьироваться в зависимости от таких факторов, как патологическое состояние, возраст, пол и вес пациента, а также способности вещества вызывать желаемый ответ у индивидуума. Эффективным количеством также является такое количество, при котором терапевтически благоприятные эффекты лечения превосходят любые токсические или неблагоприятные эффекты. Применительно к раку эффективное количество включает количество, достаточное для того, чтобы вызвать уменьшение размера опухоли и/или уменьшить скорость роста опухоли (например, подавить рост опухоли), или предотвратить или отсрочить другую нежелательную пролиферацию клеток при раке. В некоторых вариантах осуществления эффективное количество представляет собой количество, достаточное для отсрочки развития рака. В некоторых вариантах осуществления эффективное количество представляет собой количество, достаточное для предотвращения или отсрочки рецидива. В некоторых вариантах осуществления эффективное количество представляет собой количество, достаточное для снижения частоты рецидивов у индивидуума. Эффективное количество может быть введено за одно или более введений. Эффективное количество лекарственного средства или композиции может: (i) уменьшить количество раковых клеток; (ii) уменьшить размер опухоли; (iii) ингибировать, задержать, до некоторой степени замедлить и предпочтительно остановить инфильтрацию раковыми клетками периферических органов; (iv) ингибировать (т. е. до некоторой степени замедлить и предпочтительно остановить) метастазирование опухоли; (v) ингибировать рост опухоли; (vi) предотвратить или отсрочить возникновение и/или рецидив опухоли; (vii) снизить частоту рецидивов опухоли и/или (viii) облегчить до некоторой степени один или более симптомов, связанных с раком. Эффективное количество может быть введено за одно или более введений. В контексте настоящего изобретения эффективное количество лекарственного средства, соединения или фармацевтической композиции представляет собой количество, достаточное для осуществления профилактического или терапевтического лечения, будь то прямо или косвенно. В клиническом контексте понятно, что эффективное количество лекарственного средства, соединения или фармацевтической композиции может быть или не быть достигнуто в сочетании с другим лекарственным средством, соединением или фармацевтической композицией. Таким образом, «эффективное количество» может рассматриваться в контексте введения одного или более терапевтических агентов, и один

агент может считаться вводимым в эффективном количестве, если в сочетании с одним или более другими агентами может быть достигнут или достигается желаемый результат.

[54] «Клетка-хозяин», как описано в настоящем документе, относится к любому типу клеток, которые могут быть использованы в качестве клетки-хозяина, при условии, что она может быть модифицирована, как описано в настоящем документе. Например, клетка-хозяин может представлять собой клетку-хозяина с эндогенно экспрессируемой РНК-специфической аденозиндезаминазой (ADAR) или может представлять собой клетку-хозяина, в которую РНК-специфическая аденозиндезаминаза (ADAR) введена 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 стабилизированной линии клеток, такой как линии клеток млекопитающих, включая линии человеческих клеток или линии клеток нечеловеческого происхождения. В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин происходит от индивидуума, например, от человека.

[55] «Вектор рекомбинантного AAV (вектор rAAV)» относится к полинуклеотидному вектору, содержащему одну или более гетерологичных последовательностей (т. е. последовательность нуклеиновой кислоты отличного от AAV происхождения), которые фланкированы по меньшей мере одной, и в ряде вариантов осуществления двумя последовательностями инвертированных концевых повторов AAV (ITR). Такие векторы гAAV могут быть реплицированы и упакованы в инфекционные вирусные частицы, когда они присутствуют в клетке-хозяине, которая была инфицирована подходящим хелперным вирусом (или которая экспрессирует подходящие хелперные функции) и которая экспрессирует продукты генов гер и сар AAV (т. е. белки Rep и Cap AAV). Когда вектор гAAV встроен в более крупный полинуклеотид (например, в хромосому или в другой вектор, такой как плаزمид, используемая для клонирования или трансфекции), такой вектор гAAV может называться «провектором», которому может быть оказана «помощь» путем репликации и инкапсуляции при наличии функций упаковки AAV и подходящих хелперных функций. Вектор гAAV может находиться в любой из ряда форм, включая, не ограничиваясь перечисленным, плазмиды, линейные искусственные хромосомы, комплексы с липидами, формы, инкапсулированные в липосомы, и формы, инкапсулированные в вирусную частицу, в частности, частицу AAV. Вектор гAAV может быть упакован в капсид вируса AAV для получения «рекомбинантной аденоассоциированной вирусной частицы (частицы гAAV)».

[56] Последовательность «инвертированного концевой повтора (ITR) AAV» является термином, хорошо известным в данной области техники, и представляет собой последовательность из приблизительно 145 нуклеотидов, которая присутствует на обоих концах нативного одноцепочечного генома AAV. Крайние 125 нуклеотидов ITR могут присутствовать в любой из двух альтернативных ориентаций, что приводит к гетерогенности между разными геномами AAV и между двумя концами одного генома AAV. Крайние 125 нуклеотидов также содержат несколько более коротких областей самокомплементарности (обозначенных как области A, A', B, B', C, C' и D), что обеспечивает возможность внутрицепочечного спаривания оснований в этой части ITR.

[57] «Вкладыш в упаковку» относится к инструкциям, обычно включаемым в упаковки лекарственных средств для коммерческого использования, содержащим информацию о показаниях, применении, дозировке, введении, противопоказаниях, других лекарственных средствах, которые можно комбинировать с содержащимся в упаковке препаратом, и/или предупреждениях относительно применения таких лекарственных средств, и т. д.

[58] «Субъект», «пациент» или «индивидуум» включает млекопитающее, такое как человек или другое животное, и обычно является человеком. В некоторых вариантах осуществления субъект, например, пациент, которому вводят терапевтические агенты и композиции, является млекопитающим, обычно приматом, таким как человек. В некоторых вариантах осуществления примат представляет собой мартышку или человекообразную обезьяну. Субъект может быть мужчиной или женщиной и может быть любого подходящего возраста, включая младенцев, подростков, юношей, взрослых и пожилых людей. В некоторых вариантах осуществления субъект представляет собой млекопитающее, не относящееся к приматам, такое как грызун, собака, кошка, сельскохозяйственное животное, такое как корова или лошадь, и т. д.

[59] В контексте настоящего документа термин «лечение» относится к клиническому вмешательству, предназначенному для оказания благоприятных и желаемых эффектов на естественное течение клинического патологического процесса у индивидуума или в клетке, получающих лечение. В контексте настоящего изобретения желаемые эффекты лечения включают, не ограничиваясь перечисленным, снижение скорости прогрессирования заболевания, облегчение или ослабление течения заболевания, и ремиссию или улучшение прогноза. Например, индивидуума успешно «лечат», если один или более симптомов, связанных с раком, смягчены или устранены, включая, не ограничиваясь перечисленным, снижение пролиферации (или уничтожение) раковых

клеток, повышение уничтожения раковых клеток, уменьшение симптомов, связанных с заболеванием, предупреждение распространения заболеваний, предупреждение рецидива заболевания, повышение качества жизни больных, снижение дозы других лекарственных средств, необходимых для лечения заболевания, замедление прогрессирования заболевания и/или продление выживаемости индивидуумов.

## **II. Способы редактирования РНК**

[60] В настоящем документе предложены способы редактирования целевой РНК в клетке-хозяине, включающие введение рекрутирующей дезаминазу РНК (dРНК) или конструкции, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую dРНК, в клетку-хозяина (например, эукариотическую клетку), где: (1) dРНК содержит нацеливающую последовательность РНК, по меньшей мере частично комплементарную целевой РНК, и (2) dРНК способна рекрутировать РНК-специфическую аденозиндезаминазу (ADAR).

### ***Кольцевые dРНК***

[61] В одном из аспектов в настоящем документе предложены способы редактирования целевой РНК в клетке-хозяине, включающие введение рекрутирующей дезаминазу РНК (dРНК) или конструкции, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую dРНК, в клетку-хозяина (например, эукариотическую клетку), где: (1) dРНК содержит нацеливающую последовательность РНК, по меньшей мере частично комплементарную целевой РНК, (2) dРНК способна рекрутировать РНК-специфическую аденозиндезаминазу (ADAR), и (3) dРНК представляет собой кольцевую РНК или способна образовывать кольцевую РНК.

[62] В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе предложены способы редактирования целевой РНК в клетке-хозяине, включающие введение рекрутирующей дезаминазу РНК (dРНК) или конструкции, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую dРНК, в клетку-хозяина, где: (1) dРНК содержит нацеливающую последовательность РНК, по меньшей мере частично комплементарную целевой РНК, (2) dРНК способна рекрутировать эндогенно экспрессируемую ADAR клетки-хозяина для дезаминирования целевого остатка аденозина в целевой РНК, и (3) dРНК представляет собой кольцевую РНК или способна образовывать кольцевую РНК. В некоторых вариантах осуществления способ не включает введение какого-либо белка или конструкции, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую белок (например, Cas, ADAR или слитый белок из ADAR и Cas), в клетку-хозяина.

[63] В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе предложены способы редактирования целевой РНК в клетке-хозяине, включающие введение рекрутирующей дезаминазу РНК (dРНК) или конструкции, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую dРНК, в клетку-хозяина, где: (1) dРНК содержит нацеливающую последовательность РНК, по меньшей мере частично комплементарную целевой РНК, (2) dРНК способна рекрутировать эндогенно экспрессируемую ADAR клетки-хозяина для дезаминирования целевого остатка аденозина в целевой РНК, и (3) dРНК представляет собой кольцевую РНК. В некоторых вариантах осуществления способ не включает введение какого-либо белка или конструкции, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую белок (например, Cas, ADAR или слитый белок из ADAR и Cas), в клетку-хозяина.

[64] В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе предложены способы редактирования целевой РНК в клетке-хозяине, включающие введение рекрутирующей дезаминазу РНК (dРНК) или конструкции, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую dРНК, в клетку-хозяина, где: (1) dРНК содержит нацеливающую последовательность РНК, по меньшей мере частично комплементарную целевой РНК, (2) dРНК способна рекрутировать эндогенно экспрессируемую ADAR клетки-хозяина для дезаминирования целевого остатка аденозина в целевой РНК, и (3) dРНК представляет собой линейную РНК, способную образовывать кольцевую РНК. В некоторых вариантах осуществления способ не включает введение какого-либо белка или конструкции, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую белок (например, Cas, ADAR или слитый белок из ADAR и Cas), в клетку-хозяина.

[65] В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе предложены способы редактирования целевой РНК в клетке-хозяине, включающие введение рекрутирующей дезаминазу РНК (dРНК) или конструкции, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую dРНК, в клетку-хозяина, и ADAR или конструкции, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую ADAR, в клетку-хозяина, где: (1) dРНК содержит нацеливающую последовательность РНК, по меньшей мере частично комплементарную целевой РНК, (2) dРНК способна рекрутировать ADAR для дезаминирования целевого остатка аденозина («А») в целевой РНК, и (3) dРНК представляет собой кольцевую РНК или способна образовывать кольцевую 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 для клетки-хозяина. В некоторых вариантах

осуществления конструкция, содержащая нуклеиновую кислоту, кодирующую ADAR, представляет собой вектор, такой как плаزمид или вирусный вектор (например, AAV или лентивирусный вектор).

[66] В одном из аспектов в настоящей заявке предложен способ редактирования множества целевых РНК (например, по меньшей мере приблизительно 2, 3, 4, 5, 10, 20, 50, 100, 1000 или более) в клетках-хозяевах путем введения множества dРНК или одной или более конструкций, кодирующих dРНК, в клетки-хозяева.

[67] В одном из аспектов dРНК представляет собой линейную РНК, способную образовывать кольцевую РНК. В некоторых вариантах осуществления циклизацию осуществляют с использованием системы экспрессии Tornado («Twister-optimized RNA for durable overexpression - РНК, оптимизированную с помощью Twister, для устойчивой сверхэкспрессии»), как описано в источнике Litke, J.L. & Jaffrey, S.R. Highly efficient expression of circular RNA aptamers in cells using autocatalytic transcripts. *Nat Biotechnol* **37**, 667-675 (2019), полностью включенном в настоящий документ посредством ссылки. Вкратце, транскрипты, экспрессируемые Tornado, содержат представляющую интерес РНК, фланкированную рибозимами twister. Рибозим twister представляет собой любые каталитические последовательности РНК, способные к саморасщеплению. Рибозимы быстро претерпевают автокаталитическое расщепление, оставляя концы, которые лигируются РНК-лигазой.

[68] В некоторых вариантах осуществления dРНК вводят с помощью конструкции, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую dРНК. В некоторых вариантах осуществления конструкция дополнительно содержит 3'-последовательность рибозима twister, связанную с 3'-концом нуклеиновой кислоты, кодирующей dРНК. В некоторых вариантах осуществления конструкция дополнительно содержит 5'-последовательность рибозима twister, связанную с 5'-концом нуклеиновой кислоты, кодирующей dРНК. В некоторых вариантах осуществления конструкция дополнительно содержит 3'-последовательность рибозима twister, связанную с 3'-концом нуклеиновой кислоты, кодирующей dРНК, и 5'-последовательность рибозима twister, связанную с 5'-концом нуклеиновой кислоты, кодирующей dРНК. В некоторых вариантах осуществления 3'-последовательность twister представляет собой twister P3 U2A, и 5'-последовательность twister представляет собой twister P1. В некоторых вариантах осуществления 5'-последовательность twister представляет собой twister P3 U2A, и 3'-последовательность twister представляет собой twister P1. В некоторых вариантах осуществления dРНК претерпевает автокаталитическое расщепление. В некоторых вариантах осуществления

катализируемый продукт dPHK содержит 5'-гидроксильную группу и 2',3'-циклический фосфат на 3'-конце. В некоторых вариантах осуществления катализируемый продукт dPHK лигируют убиквитарной эндогенной РНК-лигазой (например, РНК-лигазой RtcB). В некоторых вариантах осуществления конструкция представляет собой плазмиду или вирусный вектор.

[69] В некоторых вариантах осуществления транскрипт dPHK также фланкирован 5'- и/или 3'-последовательностями лигирования, которые затем фланкированы 5'-рибозимом *twister* и/или 3'-рибозимом *twister*, соответственно. В некоторых вариантах осуществления dPHK содержит 3'-последовательность лигирования. В некоторых вариантах осуществления dPHK содержит 5'-последовательность лигирования. В некоторых вариантах осуществления dPHK дополнительно содержит 3'-последовательность лигирования и 5'-последовательность лигирования. В некоторых вариантах осуществления 3'-последовательность лигирования и 5'-последовательность лигирования по меньшей мере частично комплементарны друг другу. В некоторых вариантах осуществления 3'-последовательность лигирования и 5'-последовательность лигирования по меньшей мере приблизительно на 50%, по меньшей мере приблизительно на 55%, по меньшей мере приблизительно на 60%, по меньшей мере приблизительно на 65%, по меньшей мере приблизительно на 70%, по меньшей мере приблизительно на 75%, по меньшей мере приблизительно на 80%, по меньшей мере приблизительно на 85%, по меньшей мере приблизительно на 90%, по меньшей мере приблизительно на 95%, по меньшей мере приблизительно на 96%, по меньшей мере приблизительно на 97%, по меньшей мере приблизительно на 98% или по меньшей мере приблизительно на 99% комплементарны друг другу. В некоторых вариантах осуществления 3'-последовательность лигирования и 5'-последовательность лигирования полностью комплементарны друг другу.

[70] В некоторых вариантах осуществления 3'-последовательность лигирования и 5'-последовательность лигирования независимо имеют длину по меньшей мере приблизительно 20 нуклеотидов, по меньшей мере приблизительно 25 нуклеотидов, по меньшей мере приблизительно 30 нуклеотидов, по меньшей мере приблизительно 35 нуклеотидов, по меньшей мере приблизительно 40 нуклеотидов, по меньшей мере приблизительно 45 нуклеотидов, по меньшей мере приблизительно 50 нуклеотидов, по меньшей мере приблизительно 55 нуклеотидов, по меньшей мере приблизительно 60 нуклеотидов, по меньшей мере приблизительно 65 нуклеотидов, по меньшей мере приблизительно 70 нуклеотидов, по меньшей мере приблизительно 75 нуклеотидов, по

меньшей мере приблизительно 80 нуклеотидов, по меньшей мере приблизительно 85 нуклеотидов, по меньшей мере приблизительно 90 нуклеотидов, по меньшей мере приблизительно 95 нуклеотидов или по меньшей мере приблизительно 100 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления 3'-последовательность лигирования и 5'-последовательность лигирования независимо имеют длину приблизительно 20-30 нуклеотидов, приблизительно 30-40 нуклеотидов, приблизительно 40-50 нуклеотидов, приблизительно 50-60 нуклеотидов, приблизительно 60-70 нуклеотидов, приблизительно 70-80 нуклеотидов, приблизительно 80-90 нуклеотидов, приблизительно 90-100 нуклеотидов, приблизительно 100-125 нуклеотидов, приблизительно 125-150 нуклеотидов, приблизительно 20-50 нуклеотидов, приблизительно 50-100 нуклеотидов или приблизительно 100-150 нуклеотидов.

[71] В некоторых вариантах осуществления dРНК циклизуют с помощью РНК-лигазы. Неограничивающие примеры РНК-лигазы включают: RtcB, РНК-лигазу 1 T4, РНК-лигазу 2 T4, Rnl3 и Trl1. В некоторых вариантах осуществления РНК-лигаза эндогенно экспрессируется в клетке-хозяине. В некоторых вариантах осуществления РНК-лигаза представляет собой РНК-лигазу RtcB. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает введение РНК-лигазы (например, RtcB) в клетку-хозяина.

[72] В некоторых вариантах осуществления dРНК циклизуют перед введением в клетку-хозяина. В некоторых вариантах осуществления dРНК синтезирована химическим путем. В некоторых вариантах осуществления dРНК циклизуют посредством ферментативного лигирования *in vitro* (например, с использованием РНК- или ДНК-лигазы) или химического лигирования (например, с использованием бромистого цианогена или аналогичного конденсирующего агента).

#### ***dРНК, имеющая один или два конца с мякРНК***

[73] В еще одном аспекте в настоящем документе предложены способы редактирования целевой РНК в клетке-хозяине (например, эукариотической клетке), включающие введение рекрутирующей дезаминазы РНК (dРНК) или конструкции, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую dРНК, в клетку-хозяина, где dРНК содержит: (1) нацеливающую последовательность РНК, по меньшей мере частично комплементарную целевой РНК, и (2) последовательность малой ядрышковой РНК (мякРНК), связанную с 3'- и/или 5'-концами нацеливающей последовательности РНК; и где dРНК способна рекрутировать РНК-специфическую аденозиндезаминазу (ADAR).

[74] В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе предложены способы редактирования целевой РНК в клетке-хозяине (например, эукариотической

клетке), включающие введение рекрутирующей дезаминазу РНК (dРНК) или конструкции, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую dРНК, в клетку-хозяина, где dРНК содержит: (1) нацеливающую последовательность РНК, по меньшей мере частично комплементарную целевой РНК, и (2) последовательность малой ядрышковой РНК (мякРНК), связанную с 3'- и/или 5'-концами нацеливающей последовательности РНК; и где dРНК способна рекрутировать РНК-специфическую аденозиндезаминазу (ADAR) клетки-хозяина для дезаминирования целевого остатка аденозина в целевой РНК. В некоторых вариантах осуществления способ не включает введение какого-либо белка или конструкции, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую белок (например, Cas, ADAR или слитый белок из ADAR и Cas), в клетку-хозяина.

[75] В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе предложены способы редактирования целевой РНК в клетке-хозяине (например, эукариотической клетке), включающие введение (а) рекрутирующей дезаминазу РНК (dРНК) или конструкции, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую dРНК, и (b) ADAR или конструкции, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую ADAR, в клетку-хозяина, где dРНК содержит: (1) нацеливающую последовательность РНК, по меньшей мере частично комплементарную целевой РНК, и (2) последовательность малой ядрышковой РНК (мякРНК), связанную с 3'- и/или 5'-концами нацеливающей последовательности РНК; и где dРНК способна рекрутировать ADAR для дезаминирования целевого остатка аденозина 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 для клетки-хозяина. В некоторых вариантах осуществления конструкция, содержащая нуклеиновую кислоту, кодирующую ADAR, представляет собой вектор, такой как плаزمид или вирусный вектор (например, AAV или лентивирусный вектор).

[76] В одном из аспектов в настоящей заявке предложен способ редактирования множества целевых РНК (например, по меньшей мере приблизительно 2, 3, 4, 5, 10, 20, 50, 100, 1000 или более) в клетках-хозяевах путем введения множества dРНК или одной или более конструкций, кодирующих dРНК, в клетки-хозяева.

[77] Малые ядрышковые РНК (мякРНК) представляют собой малые некодирующие молекулы РНК, о которых известно, что они управляют химическими модификациями других РНК, таких как рибосомные РНК, транспортные РНК и малые ядерные РНК. Существует две основные группы мякРНК в соответствии со специфическими

особенностями их вторичной структуры: C/D-бокс и H/ACA-бокс. Оба вида структурных особенностей мякРНК позволяют им связываться с соответствующими РНК-связывающими белками (RBP) вместе с акцессорными белками, образуя функциональные комплексы малых ядрышковых рибонуклеопротеинов (мякРНП). Полагают, что C/D-бокс-мякРНК связаны с метилированием, тогда как H/ACA-бокс-мякРНК связаны с псевдоуридилированием. Другие семейства мякРНК включают, например, составные H/ACA- и C/D-бокс-мякРНК и «сиротские» мякРНК. Последовательность мякРНК, описанная в настоящем документе, может содержать встречающуюся в природе мякРНК, ее часть или ее вариант.

[78] В некоторых вариантах осуществления дРНК содержит последовательность мякРНК, связанную с 5'-концом нацеливающей последовательности РНК («5'-последовательность мякРНК»). В некоторых вариантах осуществления дРНК содержит последовательность мякРНК, связанную с 3'-концом нацеливающей последовательности РНК («3'-последовательность мякРНК»). В некоторых вариантах осуществления дРНК содержит последовательность мякРНК, связанную с 5'-концом нацеливающей последовательности РНК («5'-последовательность мякРНК»), и последовательность мякРНК, связанную с 3'-концом нацеливающей последовательности РНК («3'-последовательность мякРНК»). В некоторых вариантах осуществления последовательность мякРНК имеет длину по меньшей мере приблизительно 50 нуклеотидов, по меньшей мере приблизительно 60 нуклеотидов, по меньшей мере приблизительно 70 нуклеотидов, по меньшей мере приблизительно 80 нуклеотидов, по меньшей мере приблизительно 90 нуклеотидов, по меньшей мере приблизительно 100 нуклеотидов, по меньшей мере приблизительно 110 нуклеотидов, по меньшей мере приблизительно 120 нуклеотидов, по меньшей мере приблизительно 130 нуклеотидов, по меньшей мере приблизительно 140 нуклеотидов, по меньшей мере приблизительно 150 нуклеотидов, по меньшей мере приблизительно 160 нуклеотидов, по меньшей мере приблизительно 170 нуклеотидов, по меньшей мере приблизительно 180 нуклеотидов, по меньшей мере приблизительно 190 нуклеотидов или по меньшей мере приблизительно 200 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления последовательность мякРНК имеет длину приблизительно 50-75 нуклеотидов, приблизительно 75-100 нуклеотидов, приблизительно 100-125 нуклеотидов, приблизительно 125-150 нуклеотидов, приблизительно 150-175 нуклеотидов, приблизительно 175-200 нуклеотидов, приблизительно 50-100 нуклеотидов, приблизительно 100-150 нуклеотидов, приблизительно 150-200 нуклеотидов, приблизительно 125-175 нуклеотидов или приблизительно 100-200 нуклеотидов.

[79] В некоторых вариантах осуществления 3'-последовательность мякРНК содержит последовательность нуклеиновой кислоты согласно SEQ ID NO: 1 (5'-AAGATTGTGTGTGGATCGATGATGACTTCCATATATACATTCCTTGGAAAGCTGAACAAAATGAGTGAAAACCTCTATACCGTCATTCTCGTCTGAACTGAGGTCCAGCACATTATCTCCAACAG -3'). В некоторых вариантах осуществления 5'-последовательность мякРНК содержит последовательность нуклеиновой кислоты согласно SEQ ID NO: 2 (5'-GAGTGAGATCTTGGACCAATGATGACTTCCATACATGCATTCCTTGGAAAGCTGAACAAAATGAGTGGGAACTCTGTACTATCATCTTAGTTGAACTGAGGTCCACCGGGGGCTAA -3'). В некоторых вариантах осуществления последовательность мякРНК представляет собой последовательность C/D-бокс-мякРНК. В некоторых вариантах осуществления последовательность мякРНК представляет собой последовательность H/АСА-бокс-мякРНК. В некоторых вариантах осуществления последовательность мякРНК представляет собой последовательность составной C/D-бокс- и H/АСА-бокс-мякРНК. В некоторых вариантах осуществления последовательность мякРНК представляет собой последовательность «сиротской» мякРНК.

### ***Конструкции с промотором Pol II***

[80] В еще одном аспекте в настоящем документе предложены способы редактирования целевой РНК в клетке-хозяине, включающие введение конструкции, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую рекрутирующую дезаминазу РНК (dРНК), в клетку-хозяина, где: (1) dРНК содержит нацеливающую последовательность РНК, по меньшей мере частично комплементарную целевой РНК, (2) dРНК способна рекрутировать РНК-специфическую аденозиндезаминазу (ADAR), и (3) конструкция содержит промотор полимеразы II («промотор Pol II»), функционально связанный с нуклеиновой кислотой, кодирующей dРНК.

[81] В некоторых вариантах осуществления предложены способы редактирования целевой РНК в клетке-хозяине, включающие введение конструкции, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую рекрутирующую дезаминазу РНК (dРНК), в клетку-хозяина, где: (1) dРНК содержит нацеливающую последовательность РНК, по меньшей мере частично комплементарную целевой РНК, (2) dРНК способна рекрутировать эндогенно экспрессируемую РНК-специфическую аденозиндезаминазу (ADAR) клетки-хозяина для дезаминирования целевого остатка аденозина в целевой РНК, и (3) конструкция содержит промотор полимеразы II («промотор Pol II»), функционально связанный с нуклеиновой кислотой, кодирующей dРНК. В некоторых вариантах осуществления способ не включает введение какого-либо белка или конструкции,

содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую белок (например, Cas, ADAR или слитый белок из ADAR и Cas), в клетку-хозяина.

[82] В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе предложены способы редактирования целевой РНК в клетке-хозяине, включающие введение (a) конструкции, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую рекрутирующую дезаминазу РНК (dPHK), и (b) ADAR или конструкции, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую ADAR, в клетку-хозяина, где: (1) dPHK содержит нацеливающую последовательность РНК, по меньшей мере частично комплементарную целевой РНК, (2) dPHK способна рекрутировать РНК-специфическую аденозиндезаминазу (ADAR) для дезаминирования целевого остатка аденозина в целевой РНК, и (3) конструкция содержит промотор полимеразы II («промотор Pol II»), функционально связанный с нуклеиновой кислотой, кодирующей dPHK. 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 для клетки-хозяина. В некоторых вариантах осуществления конструкция, содержащая нуклеиновую кислоту, кодирующую ADAR, представляет собой вектор, такой как плаزمид или вирусный вектор (например, AAV или лентивирусный вектор).

[83] В одном из аспектов в настоящей заявке предложен способ редактирования множества целевых РНК (например, по меньшей мере приблизительно 2, 3, 4, 5, 10, 20, 50, 100, 1000 или более) в клетках-хозяевах путем введения множества dPHK или одной или более конструкций, кодирующих dPHK, в клетки-хозяева. В некоторых вариантах осуществления один промотор Pol II (например, CMV) управляет экспрессией двух или более dPHK.

[84] Неограничивающие примеры промоторов Pol II включают: CMV, SV40, EF-1 $\alpha$ , CAG и RSV. В некоторых вариантах осуществления промотор Pol II представляет собой промотор CMV. В некоторых вариантах осуществления промотор CMV содержит последовательность нуклеиновой кислоты согласно SEQ ID NO: 3 (5'-CGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCGCCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTA TCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCA TTATGCCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTA GTCATCGCTATTACCATGGTGATGCGGTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAG

CGGTTTGACTCACGGGGATTTCCTCAAGTCTCCACCCCATTTGACGTCAATGGGAGTTTG  
TTTTGGCACCAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTCGTAACAACCTCCGCCCCATTG  
ACGCAAATGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCT-3').

[85] В некоторых вариантах осуществления согласно любому из способов, описанных в настоящем документе, клетка-хозяин представляет собой прокариотическую клетку. 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 человеческую клетку. В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин представляет собой мышиную клетку. В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин представляет собой растительную клетку или клетку гриба.

[86] В некоторых вариантах осуществления согласно любому из способов или применению, описанным в настоящем документе, клетка-хозяин представляет собой линию клеток, такую как клетка HEK293T, HT29, A549, HepG2, RD, SF268, SW13 и HeLa. 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 клетку в постмитозном периоде. В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин представляет собой клетку центральной нервной системы (ЦНС), такую как клетка головного мозга, например, клетка мозжечка.

[87] В некоторых вариантах осуществления согласно любому из способов, описанных в настоящем документе, ADAR является эндогенной для клетки-хозяина. В некоторых вариантах осуществления РНК-специфическая аденозиндезаминаза (ADAR) естественным образом или эндогенно присутствует в клетке-хозяине, например, естественным образом или эндогенно присутствует в эукариотической клетке. В некоторых вариантах осуществления ADAR эндогенно экспрессируется клеткой-хозяином. В отдельных вариантах осуществления ADAR экзогенно вводят в клетку-хозяина. В некоторых вариантах осуществления ADAR представляет собой ADAR1 и/или ADAR2. В отдельных 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<sup>p110</sup>») и/или изоформа p150 ADAR1

(«ADAR1<sup>p150</sup>»). В некоторых вариантах осуществления ADAR представляет собой ADAR2. В некоторых вариантах осуществления ADAR представляет собой ADAR2, экспрессируемую клеткой-хозяином, например, ADAR2, экспрессируемую клетками мозжечка.

[88] В некоторых вариантах осуществления ADAR представляет собой ADAR, экзогенную для клетки-хозяина. В некоторых вариантах осуществления ADAR представляет собой высокоактивный 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 сконструированный домен, связывающий двухцепочечную нуклеиновую кислоту. В некоторых вариантах осуществления ADAR не содержит домен MCP (мембранный кофактор протеолиза), который связывается со шпилькой MS2, слитой с комплементарной последовательностью РНК в dРНК. В некоторых вариантах осуществления ADAR не содержит DSB (двухцепочечный разрыв).

[89] В некоторых вариантах осуществления согласно любому из способов, описанных в настоящем документе, клетка-хозяин имеет высокий уровень экспрессии ADAR1 (такой как ADAR1<sup>p110</sup> и/или ADAR1<sup>p150</sup>), например, по меньшей мере приблизительно любой из 10%, 20%, 50%, 100%, 2-кратного, 3-кратного, 5-кратного или более относительно уровня экспрессии белка  $\beta$ -тубулина. В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин имеет высокий уровень экспрессии ADAR2, например, по меньшей мере приблизительно любой из 10%, 20%, 50%, 100%, 2-кратного, 3-кратного, 5-кратного или более по сравнению с уровнем экспрессии белка  $\beta$ -тубулина. В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин имеет низкий уровень экспрессии ADAR3, например, не более чем приблизительно любой из 5-кратного, 3-кратного, 2-кратного, 100%, 50%, 20% или менее относительно уровня экспрессии белка  $\beta$ -тубулина.

[90] В отдельных вариантах осуществления согласно любому из способов, описанных в настоящем документе, dРНК содержит по меньшей мере приблизительно 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 отдельных вариантах осуществления согласно любому из способов, описанных в настоящем документе, dРНК содержит не более чем приблизительно 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 отдельных вариантах осуществления dРНК имеет длину приблизительно 40-260, 45-250, 50-240, 60-230, 65-220,

70-220, 70-210, 70-200, 70-190, 70-180, 70-170, 70-160, 70-150, 70-140, 70-130, 70-120, 70-110, 70-100, 70-90, 70-80, 75-200, 80-190, 85-180, 90-170, 95-160, 100-200, 100-150, 100-175, 110-200, 110-175, 110-150 или 105-140 нуклеотидов.

[91] В некоторых вариантах осуществления согласно любому из способов или применению, описанным в настоящем документе, dPHK не содержит рекрутирующий ADAR домен. «Рекрутирующий ADAR домен» может представлять собой нуклеотидную последовательность или структуру, которая с высокой аффинностью связывается с ADAR, или нуклеотидную последовательность, которая связывается с партнером по связыванию, слитым с ADAR в сконструированной конструкции ADAR. Примеры рекрутирующих ADAR доменов включают, не ограничиваясь перечисленным, домен GluR-2, GluR-B (R/G), GluR-B (Q/R), GluR-6 (R/G), 5HT2C и FlnA (Q/R); см., например, источник Wahlstedt, Helene, and Marie, "Site-selective versus promiscuous A-to-I editing." Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA 2.6 (2011): 761-771, полностью включенный в настоящий документ посредством ссылки. В некоторых вариантах осуществления dPHK не содержит двухцепочечную часть. В некоторых вариантах осуществления dPHK не содержит шпильку, такую как структура стебель-петля MS2. В некоторых вариантах осуществления dPHK является одноцепочечной. В некоторых вариантах осуществления dPHK не содержит связывающий DSB домен. В некоторых вариантах осуществления dPHK состоит из (или по существу состоит из) комплементарной последовательности РНК.

[92] В некоторых вариантах осуществления согласно любому из способов, описанных в настоящем документе, dPHK не содержит химических модификаций. В некоторых вариантах осуществления dPHK не содержит химически модифицированный нуклеотид, такой как 2'-О-метилнуклеотид или нуклеотид, имеющий тиофосфатную связь. В некоторых вариантах осуществления dPHK содержит модификации 2'-О-метилом и тиофосфатной связью только у первых трех и последних трех остатков. В некоторых вариантах осуществления dPHK не является антисмысловым олигонуклеотидом (ASO).

[93] dPHK, описанные в настоящем документе, содержат нацеливающую последовательность РНК, по меньшей мере частично комплементарную целевой РНК. В отдельных вариантах осуществления согласно любому из способов, описанных в настоящем документе, нацеливающая последовательность РНК в dPHK содержит по меньшей мере приблизительно 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 отдельных вариантах осуществления согласно любому из способов, описанных в настоящем документе, нацеливающая последовательность РНК в dPHK содержит не более чем

приблизительно 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 отдельных вариантах осуществления нацеливающая последовательность РНК в dРНК имеет длину приблизительно 40-260, 45-250, 50-240, 60-230, 65-220, 70-220, 70-210, 70-200, 70-190, 70-180, 70-170, 70-160, 70-150, 70-140, 70-130, 70-120, 70-110, 70-100, 70-90, 70-80, 75-200, 80-190, 85-180, 90-170, 95-160, 100-200, 100-150, 100-175, 110-200, 110-160, 110-175, 110-150, 140-160, 105-140 или 105-155 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления нацеливающая последовательность РНК в dРНК имеет длину приблизительно 71 нуклеотид. В некоторых вариантах осуществления dРНК имеет длину приблизительно 111 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления dРНК имеет длину приблизительно 151 нуклеотид.

[94] В некоторых вариантах осуществления нацеливающая последовательность РНК содержит цитидин, аденозин или уридин прямо напротив целевого остатка аденозина в целевой РНК. В некоторых вариантах осуществления нацеливающая последовательность РНК содержит нарушающий комплементарность цитидин прямо напротив целевого остатка аденозина в целевой РНК. В некоторых вариантах осуществления нарушающий комплементарность цитидин расположен по меньшей мере через 5 нуклеотидов, например, по меньшей мере через 10, 15, 20, 25, 30 или более нуклеотидов, от 5'-конца нацеливающей последовательности РНК. В некоторых вариантах осуществления нарушающий комплементарность цитидин расположен по меньшей мере через 20 нуклеотидов, например, по меньшей мере через 25, 30, 35 или более нуклеотидов, от 3'-конца комплементарной последовательности РНК. В некоторых вариантах осуществления нарушающий комплементарность цитидин не расположен в пределах 20 (например, 15, 10, 5 или менее) нуклеотидов от 3'-конца нацеливающей последовательности РНК. В некоторых вариантах осуществления нарушающий комплементарность цитидин расположен по меньшей мере через 20 нуклеотидов (например, по меньшей мере через 25, 30, 35 или более нуклеотидов) от 3'-конца и по меньшей мере через 5 нуклеотидов (например, по меньшей мере через 10, 15, 20, 25, 30 или более нуклеотидов) от 5'-конца нацеливающей последовательности РНК. В некоторых вариантах осуществления нарушающий комплементарность цитидин расположен в центре нацеливающей последовательности РНК. В некоторых вариантах осуществления нарушающий комплементарность цитидин расположен в пределах 20 нуклеотидов (например, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 нуклеотида) от центра нацеливающей последовательности в dРНК.

[95] В некоторых вариантах осуществления согласно любому из способов, описанных в настоящем документе, нацеливающая последовательность РНК дополнительно содержит один или более гуанозинов, например, 1, 2, 3, 4, 5, 6 или более G, то есть, каждый расположен прямо напротив нецелевого аденозина в целевой РНК. В некоторых вариантах осуществления нацеливающая последовательность РНК содержит два или более последовательных нарушающих комплементарность нуклеотидов (например, 2, 3, 4, 5 или более нарушающих комплементарность нуклеотидов) напротив нецелевого аденозина в целевой РНК.

[96] В некоторых вариантах осуществления целевая РНК содержит не более чем приблизительно 20 нецелевых A, например, не более чем приблизительно 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 нецелевой A. Гуанозины G и последовательные нарушающие комплементарность нуклеотиды, расположенные напротив нецелевых A, могут снижать эффекты нецелевого редактирования посредством ADAR.

[97] В отдельных вариантах осуществления согласно любому из способов, описанных в настоящем документе, ближайший сосед целевого остатка аденозина с 5'-конца представляет собой нуклеотид, выбранный из U, C, A и G с предпочтением  $U > C \approx A > G$ , и ближайший сосед целевого остатка аденозина с 3'-конца представляет собой нуклеотид, выбранный из G, C, A и U с предпочтением  $G > C > A \approx U$ . В отдельных вариантах осуществления целевой остаток аденозина 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 отдельных вариантах осуществления мотив из трех оснований представляет собой UAG, и dРНК содержит A, расположенный прямо напротив U в мотиве из трех оснований, C, расположенный прямо напротив целевого A, и C, G или U, расположенный прямо напротив G в мотиве из трех оснований. В некоторых вариантах осуществления мотив из трех оснований представляет собой UAG в целевой РНК, и dРНК содержит ACC, ACG или ACU, расположенный напротив UAG в целевой РНК. В отдельных вариантах осуществления мотив из трех оснований представляет собой UAG в целевой РНК, и dРНК содержит ACC, расположенный напротив UAG в целевой РНК.

[98] В некоторых вариантах осуществления согласно любому из способов, описанных в настоящем документе, целевая РНК представляет собой любую РНК, выбранную из группы, состоящей из прематричной РНК, матричной РНК, рибосомной РНК, транспортной РНК, длинной некодирующей РНК и малой РНК (например, микроРНК). В некоторых вариантах осуществления целевая РНК представляет собой

прематричную РНК. В некоторых вариантах осуществления целевая РНК представляет собой матричную РНК.

[99] В отдельных вариантах осуществления согласно любому из способов, описанных в настоящем документе, способ дополнительно включает введение ингибитора ADAR3 в клетку-хозяина. В некоторых вариантах осуществления ингибитор ADAR3 представляет собой РНКи (РНК-интерференцию) против ADAR3, такую как кшРНК (короткая шпилечная РНК) против ADAR3 или миРНК (малая интерферирующая РНК) против ADAR3. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает введение стимулятора интерферона в клетку-хозяина. В некоторых вариантах осуществления ADAR является интерферон-индуцируемой, например, ADAR представляет собой ADAR<sup>p150</sup>. В некоторых вариантах осуществления стимулятор интерферона представляет собой IFN $\alpha$ . В некоторых вариантах осуществления ингибитор ADAR3 и/или стимулятор интерферона кодируются той же конструкцией (например, вектором), которая кодирует dРНК.

[100] В отдельных вариантах осуществления согласно любому из способов, описанных в настоящем документе, эффективность редактирования целевой РНК составляет по меньшей мере приблизительно 10%, например, по меньшей мере приблизительно 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или выше. В некоторых вариантах осуществления эффективность редактирования целевой РНК составляет по меньшей мере приблизительно 40%. В некоторых вариантах осуществления эффективность редактирования определяют секвенированием по Сэнгеру. В некоторых вариантах осуществления эффективность редактирования определяют секвенированием нового поколения. В некоторых вариантах осуществления эффективность редактирования определяют путем оценки экспрессии репортерного гена, такого как флуоресцентный репортер, например, EGFP.

[101] В отдельных вариантах осуществления согласно любому из способов, описанных в настоящем документе, способ имеет низкую степень нецелевого редактирования. В некоторых вариантах осуществления способ имеет эффективность редактирования менее чем приблизительно 1% (например, не более чем приблизительно 0,5%, 0,1%, 0,05%, 0,01%, 0,001%, или менее) в отношении нецелевых А в целевой РНК. В некоторых вариантах осуществления способ не приводит к редактированию нецелевых А в целевой РНК. В некоторых вариантах осуществления способ имеет эффективность редактирования менее чем приблизительно 0,1% (например, не более чем приблизительно

0,05%, 0,01%, 0,005%, 0,001%, 0,0001%, или менее) в отношении остатков А в нецелевой РНК.

[102] В отдельных вариантах осуществления согласно любому из способов, описанных в настоящем документе, способ не вызывает иммунный ответ, такой как врожденный иммунный ответ. В некоторых вариантах осуществления способ не вызывает экспрессию интерферона и/или интерлейкина в клетке-хозяине. В некоторых вариантах осуществления способ не вызывает экспрессию IFN- $\beta$  и/или IL-6 в клетке-хозяине.

[103] Также предложены отредактированная РНК или клетки-хозяева, имеющие отредактированную РНК, полученные 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 абберантный сайт сплайсинга. В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин содержит мутантный, усеченный или неправильно уложенный белок.

[104] Методы невирусной доставки нуклеиновых кислот включают липофекцию, нуклеофекцию, микроинъекцию, биолистику, виросомы, липосомы, иммунолипосомы, конъюгаты поликатионов или липидов с нуклеиновой кислотой, электропорацию, наночастицы, экзосомы, микровезикулы, или генную пушку, голую ДНК и искусственные вирионы.

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

[106] В отдельных вариантах осуществления согласно любому из способов, описанных в настоящем документе, способ включает введение вирусного вектора (такого как AAV или лентивирусный вектор), кодирующего dРНК, в клетку-хозяина. В некоторых вариантах осуществления вектор представляет собой вектор рекомбинантного аденоассоциированного вируса (rAAV). В некоторых вариантах осуществления конструкция фланкирована одной или более последовательностями инвертированных концевых повторов (ITR) AAV. В некоторых вариантах осуществления конструкция фланкирована двумя ITR AAV. В некоторых вариантах осуществления ITR AAV представляют собой ITR серотипов AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAVrh8, AAVrh8R, AAV9, AAV10, AAVrh10, AAV11, AAV12, AAV2R471A, AAV DJ, козьего AAV, бычьего AAV или мышинового AAV. В некоторых вариантах осуществления ITR AAV представляют собой ITR AAV2. В некоторых вариантах

осуществления вектор дополнительно содержит спейсерную нуклеиновую кислоту. В некоторых вариантах осуществления спейсерная нуклеиновая кислота расположена против хода транскрипции или по ходу транскрипции от нуклеиновой кислоты, кодирующей dPHK. В некоторых вариантах осуществления вектор представляет собой самокомплементарный вектор gAAV. В некоторых вариантах осуществления вектор содержит первую последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую dPHK, и вторую последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую комплемент dPHK, при этом первая последовательность нуклеиновой кислоты может образовывать внутрицепочечные пары оснований со второй последовательностью нуклеиновой кислоты по большей части ее длины или всей ее длине. В некоторых вариантах осуществления первая последовательность нуклеиновой кислоты и вторая последовательность нуклеиновой кислоты связаны мутированным ITR AAV, где мутированный ITR AAV содержит делецию области D и содержит мутацию последовательности концевого разрешения. В некоторых вариантах осуществления вектор инкапсулирован в частицу gAAV. В некоторых вариантах осуществления вирусная частица AAV включает серотип капсида AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAVrh8, AAVrh8R, AAV9, AAV10, AAVrh10, AAV11, AAV12, AAV2R471A, AAV2/2-7m8, AAV DJ, AAV2 N587A, AAV2 E548A, AAV2 N708A, AAV2 V708K, AAV2-HBKO, AAVDJ8, AAVPHP.B, AAVPHP.eB, AAVBR1, AAVHSC15, AAVHSC17, козьего AAV, химерного AAV1/AAV2, бычьего AAV, мышинового AAV или gAAV2/HBoV1.

[107] В некоторых вариантах осуществления способ включает введение плазмиды, кодирующей dPHK, в клетку-хозяина. В некоторых вариантах осуществления способ включает электропорацию dPHK (например, синтетической dPHK) в клетку-хозяина. В некоторых вариантах осуществления способ включает трансфекцию dPHK в клетку-хозяина.

[108] После дезаминирования модификация целевой РНК и/или белка, кодируемого целевой РНК, может быть определена с использованием различных методов в зависимости от положений целевых аденозинов в целевой РНК. Например, чтобы определить, был ли «А» отредактирован в «I» в целевой РНК, могут быть использованы методы РНК-секвенирования, известные в данной области техники, для обнаружения модификации последовательности РНК. Когда целевой аденозин расположен в кодирующей области мРНК, редактирование РНК может вызвать изменения аминокислотной последовательности, кодируемой мРНК. Например, в мРНК могут быть введены точечные мутации, или врожденная или приобретенная точечная мутация в

мРНК может быть реверсирована с получением продукта(ов) гена дикого типа из-за превращения «А» в «I». Аминокислотное секвенирование методами, известными в данной области техники, может быть использовано 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 остатка аденозина (UGA или UAG) или целевых А (UAA) может создать мутацию сквозного прочитывания и/или удлиненный белок, или усеченный белок, кодируемый целевой РНК, может быть реверсирован с образованием функционального, полноразмерного белка и/или белка дикого типа. Редактирование целевой РНК может также генерировать aberrantный сайт сплайсинга и/или альтернативный сайт сплайсинга в целевой РНК, приводя таким образом к удлиненному, усеченному или неправильно уложенному белку, или aberrantный сайт сплайсинга или альтернативный сайт сплайсинга, кодируемый в целевой РНК, может быть реверсирован с образованием функционального, правильно уложенного, полноразмерного белка и/или белка дикого типа. В некоторых вариантах осуществления в настоящей заявке предполагается редактирование как врожденных, так и приобретенных генетических изменений, например, миссенс-мутации, раннего стоп-кодона, aberrantного сплайсинга или альтернативного сайта сплайсинга, кодируемого целевой РНК. Используя известные методы для оценки функции белка, кодируемого целевой РНК, можно выяснить, обеспечивает ли редактирование РНК желаемые эффекты. Поскольку дезаминирование аденозина (А) до инозина (I) может исправить мутированный А в целевом положении в мутантной РНК, кодирующей белок, идентификация дезаминирования до инозина может позволить оценить, присутствует ли функциональный белок, или является ли РНК, связанная с заболеванием или лекарственной устойчивостью, обусловленная наличием мутировавшего аденозина, реверсированной или частично реверсированной. Точно так же, поскольку дезаминирование аденозина (А) до инозина (I) может ввести точечную мутацию в получаемый белок, идентификация дезаминирования до инозина может обеспечить функциональный индикатор для определения причины заболевания или фактора, связанного с заболеванием.

[109] Когда наличие целевого аденозина вызывает aberrantный сплайсинг, регистрируемые данные могут представлять собой оценку наличия и частоты aberrantного сплайсинга. С другой стороны, когда дезаминирование целевого аденозина желательно для введения сайта сплайсинга, можно использовать аналогичные подходы для проверки того, имеет ли место требуемый тип сплайсинга. Примером подходящего

метода для идентификации наличия инозина после дезаминирования целевого аденозина является ОТ-ПЦР (ПЦР с обратной транскрипцией) и секвенирование, с использованием методов, которые хорошо известны специалисту в данной области техники.

[110] Эффекты дезаминирования целевого аденозина(ов) включают, например, точечную мутацию, ранний стоп-кодон, аберрантный сайт сплайсинга, альтернативный сайт сплайсинга и неправильную укладку получаемого белка. Эти эффекты могут вызывать структурные и функциональные изменения РНК и/или белков, связанных с заболеваниями, независимо от того, являются ли они генетически унаследованными или вызваны приобретенными генетическими мутациями, или могут вызывать структурные и функциональные изменения РНК и/или белков, связанных с возникновением лекарственной устойчивости. Следовательно, dРНК, конструкции, кодирующие dРНК, и способы редактирования РНК согласно настоящей заявке могут применяться для предупреждения 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.

[111] 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, при-микроРНК (первичная микроРНК), пре-микроРНК, рiРНК (РНК, взаимодействующая с РiWI), миРНК (малые интерферирующие РНК), мякРНК, мяРНК (малые ядерные РНК), exРНК (внеклеточную РНК) или scaРНК (малые РНК из 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 приобретение 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.

[112] Некоторые варианты осуществления настоящей заявки включают множественное редактирование целевых РНК в клетках-хозяевах, что является эффективным для скрининга различных вариантов целевого гена или различных 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 разные целевые РНК. В некоторых вариантах осуществления каждая dРНК имеет отличающуюся последовательность и/или отличающуюся целевую РНК. В некоторых вариантах осуществления способ генерирует множество (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 генерирует модификацию во 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 отличающуюся dРНК или dРНК, имеющие целевую РНК, отличающуюся от других популяций клеток-хозяев.

### **III. Рекрутирующая дезаминаза РНК, конструкции и библиотеки**

[113] В настоящем документе также предложены рекрутирующие дезаминазу РНК или конструкции, подходящие для любого из описанных в настоящем документе способов. Любая из dРНК или конструкций, описанных в этом разделе, может применяться в способах редактирования РНК и лечения, описанных в настоящем документе. Подразумевается, что любые признаки и параметры, описанные в настоящем документе для dРНК или конструкций, могут быть комбинированы друг с другом, как если бы каждая отдельная комбинация была раскрыта отдельно. dРНК, описанные в настоящем документе, не содержат tracrРНК, scРНК или гРНК, используемых в системе CRISPR/Cas. В некоторых вариантах осуществления предложена рекрутирующая дезаминаза РНК (dРНК) для дезаминирования целевого аденозина в целевой РНК путем рекрутинга ADAR, содержащей комплементарную последовательность РНК, которая гибридизуется с целевой РНК.

[114] В одном из аспектов настоящего изобретения предложена конструкция, содержащая любую из описанных в настоящем документе рекрутирующих дезаминазу РНК. В отдельных вариантах осуществления конструкция представляет собой вирусный вектор (такой как лентивирусный вектор) или плазмиду. В некоторых вариантах осуществления конструкция кодирует одну dРНК. В некоторых вариантах осуществления конструкция кодирует множество (например, приблизительно 1, 2, 3, 4, 5, 10, 20 или более) dРНК.

[115] В одном из аспектов настоящей заявки предложена библиотека, содержащая множество рекрутирующих дезаминазу РНК или множество конструкций, описанных в настоящем документе.

[116] В одном из аспектов настоящей заявки предложена композиция или клетка-хозяин, содержащая рекрутирующую дезаминазу РНК или конструкцию, описанную в настоящем документе. В отдельных вариантах осуществления клетка-хозяин представляет собой прокариотическую клетку или эукариотическую клетку. В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин представляет собой клетку млекопитающего. В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин представляет собой человеческую клетку.

### ***Кольцевые dРНК и конструкции***

[117] В одном из аспектов в настоящем документе предложены рекрутирующие дезаминазу РНК (dРНК) для редактирования целевой РНК, содержащие нацеливающую последовательность РНК, по меньшей мере частично комплементарную целевой РНК, где dРНК способна рекрутировать РНК-специфическую аденозиндезаминазу (ADAR), и где dРНК является кольцевой или способна образовывать кольцевую РНК.

[118] В некоторых вариантах осуществления dРНК представляет собой линейную РНК, способную образовывать кольцевую РНК. В некоторых вариантах осуществления dРНК циклизована методом Tornado. В некоторых вариантах осуществления транскрипт dРНК также фланкирован 5'- и/или 3'-последовательностями лигирования, которые затем фланкированы 5'-рибозимом twister и/или 3'-рибозимом twister, соответственно. В некоторых вариантах осуществления 3'-последовательность лигирования и 5'-последовательность лигирования по меньшей мере частично комплементарны друг другу. В некоторых вариантах осуществления 3'-последовательность лигирования и 5'-последовательность лигирования по меньшей мере приблизительно на 50%, по меньшей мере приблизительно на 55%, по меньшей мере приблизительно на 60%, по меньшей мере приблизительно на 65%, по меньшей мере приблизительно на 70%, по меньшей мере приблизительно на 75%, по меньшей мере приблизительно на 80%, по меньшей мере приблизительно на 85%, по меньшей мере приблизительно на 90%, по меньшей мере приблизительно на 95%, по меньшей мере приблизительно на 96%, по меньшей мере приблизительно на 97%, по меньшей мере приблизительно на 98% или по меньшей мере приблизительно на 99% комплементарны друг другу. В некоторых вариантах осуществления 3'-последовательность лигирования и 5'-последовательность лигирования полностью комплементарны друг другу.

[119] В некоторых вариантах осуществления 3'-последовательность лигирования и 5'-последовательность лигирования независимо имеют длину по меньшей мере приблизительно 20 нуклеотидов, по меньшей мере приблизительно 25 нуклеотидов, по меньшей мере приблизительно 30 нуклеотидов, по меньшей мере приблизительно 35 нуклеотидов, по меньшей мере приблизительно 40 нуклеотидов, по меньшей мере приблизительно 45 нуклеотидов, по меньшей мере приблизительно 50 нуклеотидов, по меньшей мере приблизительно 55 нуклеотидов, по меньшей мере приблизительно 60 нуклеотидов, по меньшей мере приблизительно 65 нуклеотидов, по меньшей мере приблизительно 70 нуклеотидов, по меньшей мере приблизительно 75 нуклеотидов, по меньшей мере приблизительно 80 нуклеотидов, по меньшей мере приблизительно 85 нуклеотидов, по меньшей мере приблизительно 90 нуклеотидов, по меньшей мере приблизительно 95 нуклеотидов или по меньшей мере приблизительно 100 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления 3'-последовательность лигирования и 5'-последовательность лигирования независимо имеют длину приблизительно 20-30 нуклеотидов, приблизительно 30-40 нуклеотидов, приблизительно 40-50 нуклеотидов, приблизительно 50-60 нуклеотидов, приблизительно 60-70 нуклеотидов, приблизительно 70-80 нуклеотидов, приблизительно 80-90 нуклеотидов, приблизительно 90-100 нуклеотидов, приблизительно 100-125 нуклеотидов, приблизительно 125-150 нуклеотидов, приблизительно 20-50 нуклеотидов, приблизительно 50-100 нуклеотидов или приблизительно 100-150 нуклеотидов.

[120] В некоторых вариантах осуществления dРНК циклизуют с помощью РНК-лигазы. В некоторых вариантах осуществления РНК-лигаза эндогенно экспрессируется в клетке-хозяине. В некоторых вариантах осуществления РНК-лигаза представляет собой РНК-лигазу RtcB. В некоторых вариантах осуществления РНК-лигаза RtcB эндогенно экспрессируется в клетке-хозяине. В некоторых вариантах осуществления dРНК циклизуют посредством ферментативного лигирования *in vitro* (например, с использованием РНК- или ДНК-лигазы) или химического лигирования (например, с использованием бромистого цианогена или аналогичного конденсирующего агента).

[121] Также в настоящем документе предложена конструкция, содержащая нуклеиновую кислоту, кодирующую dРНК. В некоторых вариантах осуществления dРНК вводят с помощью конструкции, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую dРНК. В некоторых вариантах осуществления конструкция дополнительно содержит 3'-последовательность рибозима *twister*, связанную с 3'-концом нуклеиновой кислоты, кодирующей dРНК. В некоторых вариантах осуществления конструкция дополнительно

содержит 5'-последовательность рибозима twister, связанную с 5'-концом нуклеиновой кислоты, кодирующей dРНК. В некоторых вариантах осуществления конструкция дополнительно содержит 3'-последовательность рибозима twister, связанную с 3'-концом нуклеиновой кислоты, кодирующей dРНК, и 5'-последовательность рибозима twister, связанную с 5'-концом нуклеиновой кислоты, кодирующей dРНК. В некоторых вариантах осуществления 3'-последовательность twister представляет собой twister P3 U2A, и 5'-последовательность twister представляет собой twister P1. В некоторых вариантах осуществления 5'-последовательность twister представляет собой twister P3 U2A, и 3'-последовательность twister представляет собой twister P1. В некоторых вариантах осуществления dРНК претерпевает автокаталитическое расщепление. В некоторых вариантах осуществления катализируемый продукт dРНК содержит 5'-гидроксильную группу и 2',3'-циклический фосфат на 3'-конце. В некоторых вариантах осуществления катализируемый продукт dРНК лигируют убиквитарной эндогенной РНК-лигазой (например, РНК-лигазой RtcB). В некоторых вариантах осуществления конструкция представляет собой плазмиду или вирусный вектор.

#### ***dРНК и конструкции, имеющие один или два конца с мякРНК***

[122] В еще одном аспекте в настоящем документе предложена рекрутирующая дезаминаза РНК (dРНК) для редактирования целевой РНК, содержащая: (1) нацеливающую последовательность РНК, по меньшей мере частично комплементарную целевой РНК, и (2) последовательность малой ядрышковой РНК (мякРНК) на 3'- и/или 5'-концах нацеливающей последовательности РНК; где dРНК способна рекрутировать РНК-специфическую аденозиндезаминазу (ADAR).

[123] В некоторых вариантах осуществления dРНК содержит последовательность мякРНК, связанную с 5'-концом нацеливающей последовательности РНК («5'-последовательность мякРНК»). В некоторых вариантах осуществления dРНК содержит последовательность мякРНК, связанную с 3'-концом нацеливающей последовательности РНК («3'-последовательность мякРНК»). В некоторых вариантах осуществления последовательность мякРНК имеет длину по меньшей мере приблизительно 50 нуклеотидов, по меньшей мере приблизительно 60 нуклеотидов, по меньшей мере приблизительно 70 нуклеотидов, по меньшей мере приблизительно 80 нуклеотидов, по меньшей мере приблизительно 90 нуклеотидов, по меньшей мере приблизительно 100 нуклеотидов, по меньшей мере приблизительно 110 нуклеотидов, по меньшей мере приблизительно 120 нуклеотидов, по меньшей мере приблизительно 130 нуклеотидов, по меньшей мере приблизительно 140 нуклеотидов, по меньшей мере приблизительно 150

нуклеотидов, по меньшей мере приблизительно 160 нуклеотидов, по меньшей мере приблизительно 170 нуклеотидов, по меньшей мере приблизительно 180 нуклеотидов, по меньшей мере приблизительно 190 нуклеотидов или по меньшей мере приблизительно 200 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления последовательность мЯКРНК имеет длину приблизительно 50-75 нуклеотидов, приблизительно 75-100 нуклеотидов, приблизительно 100-125 нуклеотидов, приблизительно 125-150 нуклеотидов, приблизительно 150-175 нуклеотидов, приблизительно 175-200 нуклеотидов, приблизительно 50-100 нуклеотидов, приблизительно 100-150 нуклеотидов, приблизительно 150-200 нуклеотидов, приблизительно 125-175 нуклеотидов или приблизительно 100-200 нуклеотидов.

[124] В некоторых вариантах осуществления 3'-последовательность мЯКРНК содержит последовательность нуклеиновой кислоты согласно SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления 5'-последовательность мЯКРНК содержит последовательность нуклеиновой кислоты согласно SEQ ID NO: 2. В некоторых вариантах осуществления последовательность мЯКРНК представляет собой последовательность C/D-бокс-мЯКРНК. В некоторых вариантах осуществления последовательность мЯКРНК представляет собой последовательность H/АСА-бокс-мЯКРНК. В некоторых вариантах осуществления последовательность мЯКРНК представляет собой последовательность составной C/D-бокс-и H/АСА-бокс-мЯКРНК. В некоторых вариантах осуществления последовательность мЯКРНК представляет собой последовательность «сиротской» мЯКРНК.

### ***Конструкции с промотором Pol II***

[125] В еще одном аспекте в настоящем документе предложена конструкция, содержащая нуклеиновую кислоту, кодирующую рекрутирующую дезаминазу РНК (dРНК) в клетке-хозяине, где: (1) dРНК содержит нацеливающую последовательность РНК, по меньшей мере частично комплементарную целевой РНК, (2) dРНК способна рекрутировать РНК-специфическую аденозиндезаминазу (ADAR), и (3) конструкция содержит промотор полимеразы II («промотор Pol II»), функционально связанный с нуклеиновой кислотой, кодирующей dРНК.

[126] В некоторых вариантах осуществления промотор Pol II функционально связан с кодирующей нуклеотидной последовательностью, так что промотор контролирует транскрипцию или экспрессию кодирующей нуклеотидной последовательности. Промотор Pol II может быть расположен с 5'-конца (против хода транскрипции) от кодирующей нуклеотидной последовательности под его контролем. Расстояние между промотором Pol II и кодирующей последовательностью может быть примерно таким же,

как расстояние между этим промотором и контролируемым им геном в гене, из которого происходит промотор. Как известно в данной области техники, изменение этого расстояния может быть компенсировано без потери функции промотора. В некоторых вариантах осуществления конструкция содержит 5'-UTR (нетранслируемая область) и/или 3'-UTR, которая регулирует транскрипцию или экспрессию кодирующей нуклеотидной последовательности. В некоторых вариантах осуществления промотор Pol II представляет собой промотор CMV. В некоторых вариантах осуществления промотор CMV содержит последовательность нуклеиновой кислоты согласно SEQ ID NO: 3. В некоторых вариантах осуществления один промотор Pol II (например, CMV) управляет экспрессией двух или более dPHK.

[127] В некоторых вариантах осуществления в соответствии с любой из dPHK, конструкций, библиотек или композиций, описанных в настоящем документе, нацеливающая последовательность РНК содержит цитидин, аденозин или уридин прямо напротив целевого аденозина, подлежащего редактированию в целевой РНК. В некоторых вариантах осуществления нацеливающая последовательность РНК дополнительно содержит один или более гуанозинов, каждый из которых расположен прямо напротив нецелевого аденозина в целевой РНК. В отдельных вариантах осуществления ближайший сосед целевого остатка аденозина с 5'-конца представляет собой нуклеотид, выбранный из U, C, A и G с предпочтением  $U > C \approx A > G$ , и ближайший сосед целевого остатка аденозина с 3'-конца представляет собой нуклеотид, выбранный из G, C, A и U с предпочтением  $G > C > A \approx U$ . В некоторых вариантах осуществления ближайший сосед целевого остатка аденозина с 5'-конца представляет собой U. В некоторых вариантах осуществления ближайший сосед целевого остатка аденозина с 5'-конца представляет собой C или A. В некоторых вариантах осуществления ближайший сосед целевого остатка аденозина с 3'-конца представляет собой G. В некоторых вариантах осуществления ближайший сосед целевого остатка аденозина с 3'-конца представляет собой C.

[128] В некоторых вариантах осуществления в соответствии с любой из dPHK, конструкций, библиотек или композиций, описанных в настоящем документе, целевой остаток аденозина 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, и dPHK содержит A, расположенный прямо напротив U в мотиве из трех оснований, C, расположенный прямо напротив целевого A, и C, G или U, расположенный прямо напротив G в мотиве из трех оснований. В отдельных

вариантах осуществления мотив из трех оснований представляет собой UAG в целевой РНК, и dРНК содержит ACC, ACG или ACU, расположенный напротив UAG в целевой РНК.

[129] В некоторых вариантах осуществления dРНК содержит нарушающий комплементарность цитидин прямо напротив целевого остатка аденозина в целевой РНК. В некоторых вариантах осуществления нарушающий комплементарность цитидин расположен 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 нарушающий комплементарность цитидин расположен по меньшей мере через 5 нуклеотидов от 5'-конца комплементарной последовательности РНК. В некоторых вариантах осуществления нарушающий комплементарность цитидин расположен по меньшей мере через 20 нуклеотидов от 3'-конца комплементарной последовательности РНК.

[130] В некоторых вариантах осуществления в соответствии с любой из dРНК, конструкций, библиотек или композиций, описанных в настоящем документе, dРНК содержит более чем приблизительно 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 отдельных вариантах осуществления dРНК имеет длину приблизительно 40-260, 45-250, 50-240, 60-230, 65-220, 70-210, 70-200, 70-190, 70-180, 70-170, 70-160, 70-150, 70-140, 70-130, 70-120, 70-110, 70-100, 70-90, 70-80, 75-200, 80-190, 85-180, 90-170, 95-160, 100-150 или 105-140 нуклеотидов.

[131] dРНК согласно настоящей заявке содержит нацеливающую последовательность РНК, которая гибридизуется с целевой РНК. Нацеливающая последовательность РНК обладает совершенной комплементарностью или существенной комплементарностью целевой РНК, что обеспечивает возможность гибридизации нацеливающей последовательности РНК с целевой РНК. В некоторых вариантах осуществления нацеливающая последовательность РНК обладает 100% комплементарностью последовательности целевой РНК. В некоторых вариантах осуществления нацеливающая последовательность РНК по меньшей мере приблизительно на 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%, или более комплементарна непрерывному отрезку из по меньшей мере приблизительно 20, 40, 60, 80, 100, 150, 200 или более нуклеотидов в целевой РНК. В некоторых вариантах осуществления дцРНК, образованная гибридизацией между нацеливающей последовательностью РНК и целевой РНК, имеет

одно или более (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более) неспаренных оснований по Уотсону-Крику (т. е. нарушений комплементарности).

[132] 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. Совершенная комплементарность между дРНК и целевой РНК обычно заставляет каталитический домен ADAR дезаминировать аденозины неселективным образом. Специфичность и эффективность ADAR могут быть модифицированы путем введения нарушений комплементарности в область дцРНК. Например, нарушение комплементарности А-С предпочтительно рекомендовано для повышения специфичности и эффективности дезаминирования подлежащего редактированию аденозина. И наоборот, в других положениях А (аденозина), отличных от целевого остатка аденозина (т. е. «нецелевом А»), нарушение комплементарности G-A может уменьшить нецелевое редактирование. Для образования дцРНК между дРНК и ее целевой РНК не обязательно требуется совершенная комплементарность при условии, что имеет место существенная комплементарность для гибридизации и образования дцРНК между дРНК и целевой РНК. В некоторых вариантах осуществления последовательность дРНК или ее область одноцепочечной РНК обладает по меньшей мере приблизительно 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% комплементарностью последовательности целевой РНК при оптимальном выравнивании. Оптимальное выравнивание может быть определено с использованием любого подходящего алгоритма выравнивания последовательностей, неограничивающие примеры которого включают алгоритм Смита-Ватермана, алгоритм Нидлмана-Вунша, алгоритмы, основанные на преобразовании Барроуза-Уилера (например, инструмент для выравнивания Барроуза-Уилера).

[133] Нуклеотиды, соседствующие с целевым аденозином, также влияют на специфичность и эффективность дезаминирования. Например, ближайший сосед целевого аденозина, подлежащего редактированию, с 5'-конца в последовательности целевой РНК имеет предпочтение  $U > C \approx A > G$ , и ближайший сосед целевого аденозина, подлежащего редактированию, с 3'-конца 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. Для одного и того же мотива из трех оснований разные конструкции dРНК 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), расположенный прямо напротив целевого аденозина, подлежащего редактированию, аденозин (A), расположенный прямо напротив уридина, и цитидин (C), гуанозин (G) или уридин (U), расположенный прямо напротив гуанозина, эффективность дезаминирования целевого аденозина выше, чем при использовании других последовательностей dРНК. В некоторых вариантах осуществления, когда dРНК содержит ACC, ACG или ACU напротив UAG целевой РНК, эффективность редактирования А в UAG целевой РНК может достигать приблизительно 25%-90% (например, приблизительно 25%-80%, 25%-70%, 25%-60%, 25%-50%, 25%-40% или 25%-30%).

[134] Помимо целевых аденозинов, в целевой РНК может присутствовать один или более аденозинов, редактирование которых нежелательно. Для этих аденозинов предпочтительно, насколько это возможно, снизить эффективность их редактирования. В данном изобретении было обнаружено, что в случае, когда гуанозин расположен прямо напротив аденозина в целевой РНК, эффективность дезаминирования значительно снижается. Следовательно, для уменьшения нецелевого дезаминирования dРНК могут быть сконструированы так, чтобы они содержали один или более гуанозинов прямо напротив одного или более аденозинов, отличных от подлежащего редактированию целевого аденозина в целевой РНК.

[135] Желаемый уровень специфичности и эффективности редактирования последовательности целевой РНК может зависеть от различных областей применения. Следуя инструкциям, приведенным в настоящей патентной заявке, специалисты в данной области техники будут способны сконструировать dРНК, имеющую последовательность, комплементарную или по существу комплементарную последовательности целевой РНК, в соответствии со своими потребностями, и методом проб и ошибок получить желаемые результаты. В контексте настоящего документа термин «нарушение комплементарности» относится к находящимся друг напротив друга нуклеотидам в двухцепочечной РНК (дцРНК), которые не образуют идеальных пар оснований в соответствии с правилами

спаривания оснований по Уотсону-Крику. Пары оснований с нарушенной комплементарностью включают, например, пары оснований G-A, C-A, U-C, A-A, G-G, C-C, U-U. Если взять в качестве примера пару A-C, где целевой остаток аденозина должен быть отредактирован в целевой РНК, dРНК конструируют так, чтобы она содержала C напротив подлежащего редактированию A, создавая нарушение комплементарности A-C в дцРНК, образуемой гибридизацией между целевой РНК и dРНК.

[136] В некоторых вариантах осуществления дцРНК, образованная гибридизацией между dРНК и целевой РНК, не содержит нарушение комплементарности. В некоторых вариантах осуществления дцРНК, образованная гибридизацией между dРНК и целевой РНК, содержит одно или более, например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или более, нарушений комплементарности (например, один и тот же тип или разные типы нарушений комплементарности). В некоторых вариантах осуществления дцРНК, образованная гибридизацией между dРНК и целевой РНК, содержит один или более видов нарушений комплементарности, например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 видов нарушений комплементарности, выбранных из группы, состоящей из G-A, C-A, U-C, A-A, G-G, C-C и U-U.

[137] Нуклеотиды с нарушением комплементарности в дцРНК, образованной в результате гибридизации между dРНК и целевой РНК, могут образовывать выпетливания, которые могут способствовать эффективности редактирования целевой РНК. Может иметь место одно (которое образуется только при целевом аденозине) или более выпетливаний, образованных нарушениями комплементарности. Дополнительные нарушения комплементарности, вызывающие выпетливание, могут располагаться против хода и/или по ходу транскрипции от целевого аденозина. Выпетливания могут представлять собой выпетливания с одним нарушением комплементарности (вызванным одной парой оснований с нарушенной комплементарностью) или выпетливания с несколькими нарушениями комплементарности (вызванными более чем одной последовательной парой оснований с нарушенной комплементарностью, например, двумя или тремя последовательными парами оснований с нарушенной комплементарностью).

[138] Нацеливающая последовательность РНК в dРНК является одноцепочечной. dРНК может быть полностью одноцепочечной или иметь одну или более (например, 1, 2, 3 или более) двухцепочечных областей и/или одну или более областей структуры стебель-петля. В некоторых вариантах осуществления нацеливающая последовательность РНК составляет по меньшей мере приблизительно 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200 нуклеотидов. В отдельных вариантах осуществления нацеливающая последовательность РНК имеет длину приблизительно 40-

260, 45-250, 50-240, 60-230, 65-220, 70-220, 70-210, 70-200, 70-190, 70-180, 70-170, 70-160, 70-150, 70-140, 70-130, 70-120, 70-110, 70-100, 70-90, 70-80, 75-200, 80-190, 85-180, 90-170, 95-160, 100-200, 100-150, 100-175, 110-200, 110-160, 110-175, 110-150, 140-160, 105-140 или 105-155 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления нацеливающая последовательность РНК в dРНК имеет длину приблизительно 71 нуклеотид. В некоторых вариантах осуществления dРНК имеет длину приблизительно 111 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления dРНК имеет длину приблизительно 151 нуклеотид.

[139] В некоторых вариантах осуществления dРНК, помимо нацеливающей последовательности РНК, дополнительно содержит области для стабилизации dРНК, например, одну или более двухцепочечных областей и/или областей структуры стебель-петля. В некоторых вариантах осуществления двухцепочечная область или область структуры стебель-петля dРНК содержит не более чем приблизительно 200, 150, 100, 50, 40, 30, 20, 10 или менее пар оснований. В некоторых вариантах осуществления dРНК не содержит область структуры стебель-петля или двухцепочечную область. В некоторых вариантах осуществления dРНК содержит рекрутирующий ADAR домен. В некоторых вариантах осуществления dРНК не содержит рекрутирующий ADAR домен.

[140] dРНК может содержать одну или более модификаций. В некоторых вариантах осуществления dРНК имеет один или более модифицированных нуклеотидов, включая модификацию азотистых оснований и/или модификацию остова. Примеры модификаций РНК включают, не ограничиваясь перечисленным, тиофосфатную модификацию остова, 2'-замены в рибозе (такие как замены 2'-О-метилом и 2'-фтором), LNA (заблокированная нуклеиновая кислота) и L-РНК. В некоторых вариантах осуществления dРНК не имеет модификаций азотистого основания или остова.

[141] В настоящей заявке также рассматривается конструкция, содержащая dРНК, описанную в настоящем документе, включая, не ограничиваясь перечисленным, любую из конструкций, описанных в разделах выше. 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. При введении конструкции в клетку-хозяина в подходящих условиях кодирующая нуклеотидная последовательность в конструкции может быть транскрибирована или экспрессирована.

[142] В некоторых вариантах осуществления конструкция содержит промотор, который функционально связан с кодирующей нуклеотидной последовательностью, так что промотор контролирует транскрипцию или экспрессию кодирующей нуклеотидной последовательности. Промотор может быть расположен с 5'-конца (против хода транскрипции) от 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, из которого происходит промотор. Как известно в данной области техники, изменение этого расстояния может быть компенсировано без потери функции промотора. В некоторых вариантах осуществления конструкция содержит 5'-UTR и/или 3'-UTR, которая регулирует транскрипцию или экспрессию кодирующей нуклеотидной последовательности. В некоторых вариантах осуществления промотор представляет собой промотор U6. В некоторых вариантах осуществления промотор представляет собой промотор Poly II, как обсуждается в разделах, описанных выше.

[143] В некоторых вариантах осуществления конструкция представляет собой вектор, кодирующий любую из dРНК, раскрытых в настоящей заявке. Термин «вектор» относится к молекуле нуклеиновой кислоты, способной переносить другую нуклеиновую кислоту, с которой она была связана. Векторы включают, не ограничиваясь перечисленным, молекулы нуклеиновой кислоты, которые являются одноцепочечными, двухцепочечными или частично двухцепочечными; молекулы нуклеиновой кислоты, которые содержат один или более свободных концов, не содержат 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. Одним из типов вектора является «плазмида», которая относится к кольцевой двухцепочечной петле ДНК, в которую могут быть вставлены дополнительные сегменты ДНК, например, с помощью стандартных методов молекулярного клонирования. Некоторые векторы способны к автономной репликации в клетке-хозяине, в которую они введены (например, бактериальные векторы, имеющие бактериальную точку начала репликации, и эписомальные векторы млекопитающих). Другие векторы (например, неэписомальные векторы млекопитающих) встраиваются в геном клетки-хозяина при введении в клетку-хозяина и, таким образом, реплицируются вместе с геномом хозяина. Более того, отдельные векторы способны управлять транскрипцией или экспрессией кодирующих нуклеотидных последовательностей, с которыми они функционально связаны. Такие векторы называются в настоящем документе «векторами экспрессии».

[144] Рекомбинантные векторы экспрессии могут содержать нуклеиновую кислоту согласно настоящей заявке 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, исходя из клеток-хозяев, используемых для транскрипции или экспрессии, которые функционально связаны с последовательностью нуклеиновой кислоты, которая должна быть транскрибирована или экспрессирована. Применительно к рекомбинантному вектору экспрессии термин «функционально связанный» подразумевает, что представляющая интерес нуклеотидная последовательность связана с регуляторным элементом(ами) таким образом, что обеспечивается экспрессия нуклеотидной последовательности (например, в системе транскрипции/трансляции *in vitro* или в клетке-хозяине, когда вектор вводят в клетку-хозяина).

[145] В некоторых вариантах осуществления вектор представляет собой вектор гAAV. В некоторых вариантах осуществления вектор гAAV представляет собой вектор, происходящий из серотипа AAV, включая, не ограничиваясь перечисленным, ITR AAV серотипа капсида AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAVrh8, AAVrh8R, AAV9, AAV10, AAVrh10, AAV11, AAV12, AAV2R471A, AAV DJ, козьего AAV, бычьего AAV или мышинового AAV, и т. п. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота в AAV содержит ITR серотипа капсида AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAVrh8, AAVrh8R, AAV9, AAV10, AAVrh10, AAV11, AAV12, AAV2R471A, AAV DJ, козьего AAV, бычьего AAV или мышинового AAV, и т. п. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота в AAV дополнительно кодирует dPHK, как описано в настоящем документе. В рамках настоящего изобретения рассматривается применение любого серотипа AAV. В некоторых вариантах осуществления вектор инкапсулирован в частицу гAAV. В некоторых вариантах осуществления вирусная частица AAV включает серотип капсида AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAVrh8, AAVrh8R, AAV9, AAV10, AAVrh10, AAV11, AAV12, AAV2R471A, AAV2/2-7m8, AAV DJ, AAV2 N587A, AAV2 E548A, AAV2 N708A, AAV2 V708K, AAV2-HBKO, AAVDJ8, AAVPHP.B, AAVPHP.eB, AAVBR1, AAVHSC15, AAVHSC17, козьего AAV, химерного AAV1/AAV2, бычьего AAV, мышинового AAV или гAAV2/HBoV1.

[146] В некоторых вариантах осуществления предложена конструкция (например, вектор, такой как вирусный вектор), содержащая нуклеотидную последовательность, кодирующую dPHK. В некоторых вариантах осуществления предложена конструкция

(например, вектор, такой как вирусный вектор), содержащая нуклеотидную последовательность, кодирующую ADAR. В некоторых вариантах осуществления предложена конструкция, содержащая первую нуклеотидную последовательность, кодирующую dPHK, 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 индуцибельным. В некоторых вариантах осуществления конструкция не кодирует ADAR. В некоторых вариантах осуществления вектор дополнительно содержит последовательность (последовательности) нуклеиновой кислоты, кодирующую ингибитор ADAR3 (например, кшPHK или миPHK ADAR3) и/или стимулятор интерферона (например, IFN- $\alpha$ ).

#### IV. Способы лечения

[147] Способы редактирования РНК и композиции, описанные в настоящем документе, могут применяться для лечения или предупреждения заболевания или состояния у индивидуума, включая, не ограничиваясь перечисленным, наследственные генетические заболевания и лекарственную устойчивость.

[148] В некоторых вариантах осуществления предложен способ редактирования целевой РНК в клетке индивидуума (например, человека) *ex vivo*, включающий редактирование целевой РНК с применением любого из описанных в настоящем документе способов редактирования РНК.

[149] В некоторых вариантах осуществления предложен способ редактирования целевой РНК в клетке индивидуума (например, человека) *ex vivo*, включающий введение dPHK или конструкции, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую dPHK, в клетку индивидуума, где dPHK содержит нацеливающую последовательность РНК, которая гибридизуется с целевой РНК, где dPHK способна рекрутировать ADAR для дезаминирования целевого остатка аденозина в целевой РНК, и где dPHK представляет собой кольцевую РНК или способна образовывать кольцевую РНК.

[150] В некоторых вариантах осуществления предложен способ редактирования целевой РНК в клетке индивидуума (например, человека) *ex vivo*, включающий введение dPHK или конструкции, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую dPHK, в клетку индивидуума, где dPHK содержит (1) нацеливающую последовательность РНК, которая гибридизуется с целевой РНК, и (2) последовательность малой ядрышковой РНК

(мякРНК), связанную с 3'- и/или 5'-концами нацеливающей последовательности РНК, и где dРНК способна рекрутировать ADAR для дезаминирования целевого остатка аденозина в целевой РНК.

[151] В некоторых вариантах осуществления предложен способ редактирования целевой РНК в клетке индивидуума (например, человека) *ex vivo*, включающий введение конструкции, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую dРНК, в клетку индивидуума, где dРНК содержит нацеливающую последовательность РНК, которая гибридизуется с целевой РНК, где dРНК способна рекрутировать ADAR для дезаминирования целевого остатка аденозина в целевой РНК, и где конструкция содержит промотор полимеразы II («промотор Pol II»), функционально связанный с нуклеиновой кислотой, кодирующей dРНК. В некоторых вариантах осуществления ADAR экспрессируется эндогенно. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает введение ADAR или конструкции, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую ADAR, в клетку-хозяина.

[152] 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, лекарственную устойчивость). В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает получение клетки от индивидуума.

[153] В некоторых вариантах осуществления предложен способ лечения или предупреждения заболевания или состояния у индивидуума (например, человека), включающий редактирование целевой РНК, связанной с указанным заболеванием или состоянием, в клетке индивидуума с применением любого из способов редактирования РНК, описанных в настоящем документе.

[154] В некоторых вариантах осуществления предложен способ лечения или предупреждения заболевания или состояния у индивидуума (например, человека), включающий введение dРНК или конструкции, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую dРНК, в выделенную клетку индивидуума *ex vivo*, где dРНК содержит нацеливающую последовательность РНК, которая гибридизуется с целевой РНК, связанной с указанным заболеванием или состоянием, где dРНК способна рекрутировать ADAR для дезаминирования целевого остатка аденозина в целевой РНК, и где dРНК представляет собой кольцевую РНК или способна образовывать кольцевую РНК.

[155] В некоторых вариантах осуществления предложен способ лечения или предупреждения заболевания или состояния у индивидуума (например, человека), включающий введение dРНК или конструкции, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую dРНК, в выделенную клетку индивидуума *ex vivo*, где dРНК содержит (1) нацеливающую последовательность РНК, которая гибридизуется с целевой РНК, и (2) последовательность малой ядрышковой РНК (мякРНК), связанную с 3'- и/или 5'-концами нацеливающей последовательности РНК, и где dРНК способна рекрутировать ADAR для дезаминирования целевого остатка аденозина в целевой РНК.

[156] В некоторых вариантах осуществления предложен способ лечения или предупреждения заболевания или состояния у индивидуума (например, человека), включающий введение конструкции, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую dРНК, в выделенную клетку индивидуума *ex vivo*, где dРНК содержит нацеливающую последовательность РНК, которая гибридизуется с целевой РНК, где dРНК способна рекрутировать ADAR для дезаминирования целевого остатка аденозина в целевой РНК, и где конструкция содержит промотор полимеразы II («промотор Pol II»), функционально связанный с нуклеиновой кислотой, кодирующей dРНК.

[157] В некоторых вариантах осуществления ADAR представляет собой эндогенно экспрессируемую ADAR в выделенной клетке. В некоторых вариантах осуществления способ включает введение ADAR или конструкции, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую 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, имеющей 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, лекарственную устойчивость).

[158] В некоторых вариантах осуществления предложен способ лечения или предупреждения заболевания или состояния у индивидуума (например, человека), включающий введение эффективного количества dРНК или конструкции, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую dРНК, индивидууму, где dРНК содержит нацеливающую последовательность РНК, которая гибридизуется с целевой РНК, связанной с указанным заболеванием или состоянием, где dРНК способна рекрутировать ADAR для дезаминирования целевого остатка аденозина в целевой РНК, и где dРНК представляет собой кольцевую РНК или способна образовывать кольцевую РНК.

[159] В некоторых вариантах осуществления предложен способ лечения или предупреждения заболевания или состояния у индивидуума (например, человека), включающий введение эффективного количества dРНК или конструкции, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую dРНК, индивидууму, где dРНК содержит (1) нацеливающую последовательность РНК, которая гибридизуется с целевой РНК, и (2) последовательность малой ядрышковой РНК (мякРНК), связанную с 3'- и/или 5'-концами нацеливающей последовательности РНК, и где dРНК способна рекрутировать ADAR для дезаминирования целевого остатка аденозина в целевой РНК.

[160] В некоторых вариантах осуществления предложен способ лечения или предупреждения заболевания или состояния у индивидуума (например, человека), включающий введение эффективного количества конструкции, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую dРНК, индивидууму, где dРНК содержит нацеливающую последовательность РНК, которая гибридизуется с целевой РНК, где dРНК способна рекрутировать ADAR для дезаминирования целевого остатка аденозина в целевой РНК, и где конструкция содержит промотор полимеразы II («промотор Pol II»), функционально связанный с нуклеиновой кислотой, кодирующей dРНК.

[161] В некоторых вариантах осуществления ADAR представляет собой эндогенно экспрессируемую ADAR в клетках индивидуума. В некоторых вариантах осуществления способ включает введение ADAR или конструкции, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую ADAR, индивидууму. 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, лекарственную устойчивость).

[162] Заболевания и состояния, подходящие для лечения с применением способов согласно настоящей заявке, 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 согласно настоящей заявке, включают, не ограничиваясь перечисленным, *TP53*<sup>W53X</sup> (например, 158G>A), связанную с раком, *IDUA*<sup>W402X</sup> (например, мутация TGG>TAG в экзоне 9), связанную с мукополисахаридозом типа I (МПС I), *COL3A1*<sup>W1278X</sup> (например, мутация 3833G>A), связанную с синдромом Элерса-Данлоса, *BMPR2*<sup>W298X</sup> (например, 893G>A), связанную с первичной легочной гипертензией, *AH1*<sup>W725X</sup> (например, 2174G>A), связанную с синдромом Жубер, *FANCC*<sup>W506X</sup> (например, 1517G>A),

связанную с анемией Фанкони, *MYBPC3*<sup>W1098X</sup> (например, 3293G>A), связанную с первичной семейной гипертрофической кардиомиопатией, и *IL2RG*<sup>W237X</sup> (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 моногенное заболевание. В некоторых вариантах осуществления заболевание или состояние представляет собой полигенное заболевание.

[163] В некоторых вариантах осуществления предложен способ лечения рака, связанного с мутацией в целевой РНК (например, мутацией G>A), у индивидуума, включающий введение dРНК или конструкции, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую dРНК, в выделенную клетку индивидуума *ex vivo*, где dРНК содержит нацеливающую последовательность РНК, которая гибридизуется с целевой РНК, связанной с указанным заболеванием или состоянием, где dРНК способна рекрутировать ADAR для дезаминирования целевого остатка аденозина в целевой РНК, и где dРНК представляет собой кольцевую РНК или способна образовывать кольцевую РНК.

[164] В некоторых вариантах осуществления предложен способ лечения рака, связанного с мутацией в целевой РНК (например, мутацией G>A), у индивидуума, включающий введение dРНК или конструкции, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую dРНК, в выделенную клетку индивидуума *ex vivo*, где dРНК содержит (1) нацеливающую последовательность РНК, которая гибридизуется с целевой РНК, и (2) последовательность малой ядрышковой РНК (мякРНК), связанную с 3'- и/или 5'-концами нацеливающей последовательности РНК, и где dРНК способна рекрутировать ADAR для дезаминирования целевого остатка аденозина в целевой РНК.

[165] В некоторых вариантах осуществления предложен способ лечения рака, связанного с мутацией в целевой РНК (например, мутацией G>A), у индивидуума, включающий введение конструкции, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую dРНК, в выделенную клетку индивидуума *ex vivo*, где dРНК содержит нацеливающую последовательность РНК, которая гибридизуется с целевой РНК, где dРНК способна рекрутировать ADAR для дезаминирования целевого остатка аденозина в целевой РНК, и где конструкция содержит промотор полимеразы II («промотор Pol II»), функционально связанный с нуклеиновой кислотой, кодирующей dРНК.

[166] В некоторых вариантах осуществления ADAR представляет собой эндогенно экспрессируемую ADAR в выделенной клетке. В некоторых вариантах осуществления способ включает введение ADAR или конструкции, содержащей нуклеиновую кислоту,

кодирующую ADAR, в выделенную клетку. В некоторых вариантах осуществления целевая РНК представляет собой *TP53*<sup>W53X</sup> (например, 158G>A). В некоторых вариантах осуществления dРНК содержит последовательность нуклеиновой кислоты согласно SEQ ID NO: 4 (5'-GGGAGCAGCCUCUGGCAUUCUGGGAGCUUCAUCUGGACCUGGGUCUUCAGUGAACCAUUGUCAAUAUCGUCCGGGGACAGCAUCAAUAUCAUCAUUGCUUGGGACGGCAA-3').

[167] В некоторых вариантах осуществления предложен способ лечения или предупреждения рака, связанного с мутацией в целевой РНК (например, мутацией G>A), у индивидуума, включающий введение эффективного количества dРНК или конструкции, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую dРНК, индивидууму, где dРНК содержит нацеливающую последовательность РНК, которая гибридизуется с целевой РНК, связанной с указанным заболеванием или состоянием, где dРНК способна рекрутировать ADAR для дезаминирования целевого остатка аденозина в целевой РНК, и где dРНК представляет собой кольцевую РНК или способна образовывать кольцевую РНК.

[168] В некоторых вариантах осуществления предложен способ лечения или предупреждения рака, связанного с мутацией в целевой РНК (например, мутацией G>A), у индивидуума, включающий введение эффективного количества dРНК или конструкции, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую dРНК, индивидууму, где dРНК содержит (1) нацеливающую последовательность РНК, которая гибридизуется с целевой РНК, и (2) последовательность малой ядрышковой РНК (мякРНК), связанную с 3'- и/или 5'-концами нацеливающей последовательности РНК, и где dРНК способна рекрутировать ADAR для дезаминирования целевого остатка аденозина в целевой РНК.

[169] В некоторых вариантах осуществления предложен способ лечения или предупреждения рака, связанного с мутацией в целевой РНК (например, мутацией G>A), у индивидуума, включающий введение эффективного количества конструкции, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую dРНК, индивидууму, где dРНК содержит нацеливающую последовательность РНК, которая гибридизуется с целевой РНК, где dРНК способна рекрутировать ADAR для дезаминирования целевого остатка аденозина в целевой РНК, и где конструкция содержит промотор полимеразы II («промотор Pol II»), функционально связанный с нуклеиновой кислотой, кодирующей dРНК.

[170] В некоторых вариантах осуществления ADAR представляет собой эндогенно экспрессируемую ADAR в клетках индивидуума. В некоторых вариантах осуществления способ включает введение ADAR или конструкции, содержащей нуклеиновую кислоту,

кодирующую ADAR, индивидууму. В некоторых вариантах осуществления целевая РНК представляет собой  $TP53^{W53X}$  (например, 158G>A). В некоторых вариантах осуществления dРНК содержит последовательность нуклеиновой кислоты согласно SEQ ID NO: 4.

[171] В некоторых вариантах осуществления предложен способ лечения МПС I (например, синдрома Гурлер или синдрома Шейе), связанного с мутацией в целевой РНК (например, мутацией G>A), у индивидуума, включающий введение dРНК или конструкции, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую dРНК, в выделенную клетку индивидуума *ex vivo*, где dРНК содержит нацеливающую последовательность РНК, которая гибридизуется с целевой РНК, связанной с указанным заболеванием или состоянием, где dРНК способна рекрутировать ADAR для дезаминирования целевого остатка аденозина в целевой РНК, и где dРНК представляет собой кольцевую РНК или способна образовывать кольцевую РНК.

[172] В некоторых вариантах осуществления предложен способ лечения МПС I (например, синдрома Гурлер или синдрома Шейе), связанного с мутацией в целевой РНК (например, мутацией G>A), у индивидуума, включающий введение dРНК или конструкции, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую dРНК, в выделенную клетку индивидуума *ex vivo*, где dРНК содержит (1) нацеливающую последовательность РНК, которая гибридизуется с целевой РНК, и (2) последовательность малой ядрышковой РНК (мякРНК), связанную с 3'- и/или 5'-концами нацеливающей последовательности РНК, и где dРНК способна рекрутировать ADAR для дезаминирования целевого остатка аденозина в целевой РНК.

[173] В некоторых вариантах осуществления предложен способ лечения МПС I (например, синдрома Гурлер или синдрома Шейе), связанного с мутацией в целевой РНК (например, мутацией G>A), у индивидуума, включающий введение конструкции, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую dРНК, в выделенную клетку индивидуума *ex vivo*, где dРНК содержит нацеливающую последовательность РНК, которая гибридизуется с целевой РНК, где dРНК способна рекрутировать ADAR для дезаминирования целевого остатка аденозина в целевой РНК, и где конструкция содержит промотор полимеразы II («промотор Pol II»), функционально связанный с нуклеиновой кислотой, кодирующей dРНК.

[174] В некоторых вариантах осуществления ADAR представляет собой эндогенно экспрессируемую ADAR в выделенной клетке. В некоторых вариантах осуществления способ включает введение ADAR или конструкции, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую ADAR, в выделенную клетку. В некоторых вариантах осуществления

целевая РНК представляет собой *IDUA*<sup>W402X</sup> (например, мутация TGG>TAG в экзоне 9). В некоторых вариантах осуществления dРНК содержит последовательность нуклеиновой кислоты согласно SEQ ID NO: 5 (5'-GACGCCCCACCGUGUGGUUGCUGUCCAGGACGGUCCCGGCCUGCGACACUUCGGCCCAGAGCUGCUCCUCAUCUGCGGGGCGGGGGGGGGGCCGUCGCCGCGUGGGGGUCGUUG-3').

[175] В некоторых вариантах осуществления предложен способ лечения или предупреждения МПС I (например, синдрома Гурлер или синдрома Шейе), связанного с мутацией в целевой РНК (например, мутацией G>A), у индивидуума, включающий введение эффективного количества dРНК или конструкции, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую dРНК, индивидууму, где dРНК содержит нацеливающую последовательность РНК, которая гибридизуется с целевой РНК, связанной с указанным заболеванием или состоянием, где dРНК способна рекрутировать ADAR для дезаминирования целевого остатка аденозина в целевой РНК, и где dРНК представляет собой кольцевую РНК или способна образовывать кольцевую РНК.

[176] В некоторых вариантах осуществления предложен способ лечения или предупреждения МПС I (например, синдрома Гурлер или синдрома Шейе), связанного с мутацией в целевой РНК (например, мутацией G>A), у индивидуума, включающий введение эффективного количества dРНК или конструкции, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую dРНК, индивидууму, где dРНК содержит (1) нацеливающую последовательность РНК, которая гибридизуется с целевой РНК, и (2) последовательность малой ядрышковой РНК (мякРНК), связанную с 3'- и/или 5'-концами нацеливающей последовательности РНК, и где dРНК способна рекрутировать ADAR для дезаминирования целевого остатка аденозина в целевой РНК.

[177] В некоторых вариантах осуществления предложен способ лечения или предупреждения МПС I (например, синдрома Гурлер или синдрома Шейе), связанного с мутацией в целевой РНК (например, мутацией G>A), у индивидуума, включающий введение эффективного количества конструкции, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую dРНК, индивидууму, где dРНК содержит нацеливающую последовательность РНК, которая гибридизуется с целевой РНК, где dРНК способна рекрутировать ADAR для дезаминирования целевого остатка аденозина в целевой РНК, и где конструкция содержит промотор полимеразы II («промотор Pol II»), функционально связанный с нуклеиновой кислотой, кодирующей dРНК.

[178] В некоторых вариантах осуществления ADAR представляет собой эндогенно экспрессируемую ADAR в клетках индивидуума. В некоторых вариантах осуществления

способ включает введение ADAR или конструкции, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую ADAR, индивидууму. В некоторых вариантах осуществления целевая РНК представляет собой *IDUA*<sup>W402X</sup> (например, мутация TGG>TAG в экзоне 9). В некоторых вариантах осуществления dРНК содержит последовательность нуклеиновой кислоты согласно SEQ ID NO: 5.

[179] В некоторых вариантах осуществления предложен способ лечения заболевания или состояния, относящегося к синдрому Элерса-Данлоса, связанного с мутацией в целевой РНК (например, мутацией G>A), у индивидуума, включающий введение dРНК или конструкции, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую dРНК, в выделенную клетку индивидуума *ex vivo*, где dРНК содержит нацеливающую последовательность РНК, которая гибридизуется с целевой РНК, связанной с указанным заболеванием или состоянием, где dРНК способна рекрутировать ADAR для дезаминирования целевого остатка аденозина в целевой РНК, и где dРНК представляет собой кольцевую РНК или способна образовывать кольцевую РНК.

[180] В некоторых вариантах осуществления предложен способ лечения заболевания или состояния, относящегося к синдрому Элерса-Данлоса, связанного с мутацией в целевой РНК (например, мутацией G>A), у индивидуума, включающий введение dРНК или конструкции, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую dРНК, в выделенную клетку индивидуума *ex vivo*, где dРНК содержит (1) нацеливающую последовательность РНК, которая гибридизуется с целевой РНК, и (2) последовательность малой ядрышковой РНК (мякРНК), связанную с 3'- и/или 5'-концами нацеливающей последовательности РНК, и где dРНК способна рекрутировать ADAR для дезаминирования целевого остатка аденозина в целевой РНК.

[181] В некоторых вариантах осуществления предложен способ лечения заболевания или состояния, относящегося к синдрому Элерса-Данлоса, связанного с мутацией в целевой РНК (например, мутацией G>A), у индивидуума, включающий введение конструкции, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую dРНК, в выделенную клетку индивидуума *ex vivo*, где dРНК содержит нацеливающую последовательность РНК, которая гибридизуется с целевой РНК, где dРНК способна рекрутировать ADAR для дезаминирования целевого остатка аденозина в целевой РНК, и где конструкция содержит промотор полимеразы II («промотор Pol II»), функционально связанный с нуклеиновой кислотой, кодирующей dРНК.

[182] В некоторых вариантах осуществления ADAR представляет собой эндогенно экспрессируемую ADAR в выделенной клетке. В некоторых вариантах осуществления

способ включает введение ADAR или конструкции, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую ADAR, в выделенную клетку. В некоторых вариантах осуществления целевая РНК представляет собой *COL3A1*<sup>W1278X</sup> (например, мутация 3833G>A). В некоторых вариантах осуществления dРНК содержит последовательность нуклеиновой кислоты согласно SEQ ID NO: 6 (5'-CAUAUUACAGAAUACCUUGAUAGCAUCCAAUUU GCAUCCUUGGUUAGGGUCAACCCAGUAUUCUCCACUCUUGAGUUCAGGAUGGCAG AAUUUCAGGUCUCUGCAGUUUCU-3').

[183] В некоторых вариантах осуществления предложен способ лечения или предупреждения синдрома Элерса-Данлоса, связанного с мутацией в целевой РНК (например, мутацией G>A), у индивидуума, включающий введение эффективного количества dРНК или конструкции, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую dРНК, индивидууму, где dРНК содержит нацеливающую последовательность РНК, которая гибридизуется с целевой РНК, связанной с указанным заболеванием или состоянием, где dРНК способна рекрутировать ADAR для дезаминирования целевого остатка аденозина в целевой РНК, и где dРНК представляет собой кольцевую РНК или способна образовывать кольцевую РНК.

[184] В некоторых вариантах осуществления предложен способ лечения или предупреждения синдрома Элерса-Данлоса, связанного с мутацией в целевой РНК (например, мутацией G>A), у индивидуума, включающий введение эффективного количества dРНК или конструкции, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую dРНК, индивидууму, где dРНК содержит (1) нацеливающую последовательность РНК, которая гибридизуется с целевой РНК, и (2) последовательность малой ядрышковой РНК (мякРНК), связанную с 3'- и/или 5'-концами нацеливающей последовательности РНК, и где dРНК способна рекрутировать ADAR для дезаминирования целевого остатка аденозина в целевой РНК.

[185] В некоторых вариантах осуществления предложен способ лечения или предупреждения синдрома Элерса-Данлоса, связанного с мутацией в целевой РНК (например, мутацией G>A), у индивидуума, включающий введение эффективного количества конструкции, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую dРНК, индивидууму, где dРНК содержит нацеливающую последовательность РНК, которая гибридизуется с целевой РНК, где dРНК способна рекрутировать ADAR для дезаминирования целевого остатка аденозина в целевой РНК, и где конструкция содержит промотор полимеразы II («промотор Pol II»), функционально связанный с нуклеиновой кислотой, кодирующей dРНК.

[186] В некоторых вариантах осуществления ADAR представляет собой эндогенно экспрессируемую ADAR в клетках индивидуума. В некоторых вариантах осуществления способ включает введение ADAR или конструкции, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую ADAR, индивидууму. В некоторых вариантах осуществления целевая РНК представляет собой *COL3A1*<sup>W1278X</sup> (например, мутация 3833G>A). В некоторых вариантах осуществления dРНК содержит последовательность нуклеиновой кислоты согласно SEQ ID NO: 6.

[187] В некоторых вариантах осуществления предложен способ лечения первичной легочной гипертензии, связанной с мутацией в целевой РНК (например, мутацией G>A), у индивидуума, включающий введение dРНК или конструкции, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую dРНК, в выделенную клетку индивидуума *ex vivo*, где dРНК содержит нацеливающую последовательность РНК, которая гибридизуется с целевой РНК, связанной с указанным заболеванием или состоянием, где dРНК способна рекрутировать ADAR для дезаминирования целевого остатка аденозина в целевой РНК, и где dРНК представляет собой кольцевую РНК или способна образовывать кольцевую РНК.

[188] В некоторых вариантах осуществления предложен способ лечения первичной легочной гипертензии, связанной с мутацией в целевой РНК (например, мутацией G>A), у индивидуума, включающий введение dРНК или конструкции, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую dРНК, в выделенную клетку индивидуума *ex vivo*, где dРНК содержит (1) нацеливающую последовательность РНК, которая гибридизуется с целевой РНК, и (2) последовательность малой ядрышковой РНК (мякРНК), связанную с 3'- и/или 5'-концами нацеливающей последовательности РНК, и где dРНК способна рекрутировать ADAR для дезаминирования целевого остатка аденозина в целевой РНК.

[189] В некоторых вариантах осуществления предложен способ лечения первичной легочной гипертензии, связанной с мутацией в целевой РНК (например, мутацией G>A), у индивидуума, включающий введение конструкции, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую dРНК, в выделенную клетку индивидуума *ex vivo*, где dРНК содержит нацеливающую последовательность РНК, которая гибридизуется с целевой РНК, где dРНК способна рекрутировать ADAR для дезаминирования целевого остатка аденозина в целевой РНК, и где конструкция содержит промотор полимеразы II («промотор Pol II»), функционально связанный с нуклеиновой кислотой, кодирующей dРНК.

[190] В некоторых вариантах осуществления ADAR представляет собой эндогенно экспрессируемую ADAR в выделенной клетке. В некоторых вариантах осуществления

способ включает введение ADAR или конструкции, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую ADAR, в выделенную клетку. В некоторых вариантах осуществления целевая РНК представляет собой *BMPR2*<sup>W298X</sup> (например, 893G>A). В некоторых вариантах осуществления dРНК содержит последовательность нуклеиновой кислоты согласно SEQ ID NO: 7 (5'-GUGAAGAUAAAGCCAGUCCUCUAGUAAACAGAAUGAGCAA GACGGCAAGAGCUUACCCAGUCACUUGUGUGGAGACUUAAAUACUUGCAUAAAG AUCCAUUGGGGAUAGUACUC-3').

[191] В некоторых вариантах осуществления предложен способ лечения или предупреждения первичной легочной гипертензии, связанной с мутацией в целевой РНК (например, мутацией G>A), у индивидуума, включающий введение эффективного количества dРНК или конструкции, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую dРНК, индивидууму, где dРНК содержит нацеливающую последовательность РНК, которая гибридизуется с целевой РНК, связанной с указанным заболеванием или состоянием, где dРНК способна рекрутировать ADAR для дезаминирования целевого остатка аденозина в целевой РНК, и где dРНК представляет собой кольцевую РНК или способна образовывать кольцевую РНК.

[192] В некоторых вариантах осуществления предложен способ лечения или предупреждения первичной легочной гипертензии, связанной с мутацией в целевой РНК (например, мутацией G>A), у индивидуума, включающий введение эффективного количества dРНК или конструкции, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую dРНК, индивидууму, где dРНК содержит (1) нацеливающую последовательность РНК, которая гибридизуется с целевой РНК, и (2) последовательность малой ядрышковой РНК (мякРНК), связанную с 3'- и/или 5'-концами нацеливающей последовательности РНК, и где dРНК способна рекрутировать ADAR для дезаминирования целевого остатка аденозина в целевой РНК.

[193] В некоторых вариантах осуществления предложен способ лечения или предупреждения первичной легочной гипертензии, связанной с мутацией в целевой РНК (например, мутацией G>A), у индивидуума, включающий введение эффективного количества dРНК индивидууму, где dРНК содержит нацеливающую последовательность РНК, которая гибридизуется с целевой РНК, где dРНК способна рекрутировать ADAR для дезаминирования целевого остатка аденозина в целевой РНК, и где конструкция содержит промотор полимеразы II («промотор Pol II»), функционально связанный с нуклеиновой кислотой, кодирующей dРНК.

[194] В некоторых вариантах осуществления ADAR представляет собой эндогенно экспрессируемую ADAR в клетках индивидуума. В некоторых вариантах осуществления способ включает введение ADAR или конструкции, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую ADAR, индивидууму. В некоторых вариантах осуществления целевая РНК представляет собой *BMPR2*<sup>W298X</sup> (например, 893G>A). В некоторых вариантах осуществления dРНК содержит последовательность нуклеиновой кислоты согласно SEQ ID NO: 7.

[195] В некоторых вариантах осуществления предложен способ лечения синдрома Жубер, связанного с мутацией в целевой РНК (например, мутацией G>A), у индивидуума, включающий введение dРНК или конструкции, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую dРНК, в выделенную клетку индивидуума *ex vivo*, где dРНК содержит нацеливающую последовательность РНК, которая гибридизуется с целевой РНК, связанной с указанным заболеванием или состоянием, где dРНК способна рекрутировать ADAR для дезаминирования целевого остатка аденозина в целевой РНК, и где dРНК представляет собой кольцевую РНК или способна образовывать кольцевую РНК.

[196] В некоторых вариантах осуществления предложен способ лечения синдрома Жубер, связанного с мутацией в целевой РНК (например, мутацией G>A), у индивидуума, включающий введение dРНК или конструкции, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую dРНК, в выделенную клетку индивидуума *ex vivo*, где dРНК содержит (1) нацеливающую последовательность РНК, которая гибридизуется с целевой РНК, и (2) последовательность малой ядрышковой РНК (мякРНК), связанную с 3'- и/или 5'-концами нацеливающей последовательности РНК, и где dРНК способна рекрутировать ADAR для дезаминирования целевого остатка аденозина в целевой РНК.

[197] В некоторых вариантах осуществления предложен способ лечения синдрома Жубер, связанного с мутацией в целевой РНК (например, мутацией G>A), у индивидуума, включающий введение конструкции, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую dРНК, в выделенную клетку индивидуума *ex vivo*, где dРНК содержит нацеливающую последовательность РНК, которая гибридизуется с целевой РНК, где dРНК способна рекрутировать ADAR для дезаминирования целевого остатка аденозина в целевой РНК, и где конструкция содержит промотор полимеразы II («промотор Pol II»), функционально связанный с нуклеиновой кислотой, кодирующей dРНК.

[198] В некоторых вариантах осуществления ADAR представляет собой эндогенно экспрессируемую ADAR в выделенной клетке. В некоторых вариантах осуществления способ включает введение ADAR или конструкции, содержащей нуклеиновую кислоту,

кодирующую ADAR, в выделенную клетку. В некоторых вариантах осуществления целевая РНК представляет собой *AHI1*<sup>W725X</sup> (например, 2174G>A). В некоторых вариантах осуществления dРНК содержит последовательность нуклеиновой кислоты согласно SEQ ID NO: 8 (5'-GUGAACGUCAAACUGUCGGACCAAUAUGGCAGAAUCUUCUCUCAUCU CAACUUUCCAUAUCCGUAUCAUGGAAUCAUAGCAUCCUGUAACUACUAGCUCUCU UACAGCUGG-3').

[199] В некоторых вариантах осуществления предложен способ лечения или предупреждения синдрома Жубер, связанного с мутацией в целевой РНК (например, мутацией G>A), у индивидуума, включающий введение эффективного количества dРНК или конструкции, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую dРНК, индивидууму, где dРНК содержит нацеливающую последовательность РНК, которая гибридизуется с целевой РНК, связанной с указанным заболеванием или состоянием, где dРНК способна рекрутировать ADAR для дезаминирования целевого остатка аденозина в целевой РНК, и где dРНК представляет собой кольцевую РНК или способна образовывать кольцевую РНК.

[200] В некоторых вариантах осуществления предложен способ лечения или предупреждения синдрома Жубер, связанного с мутацией в целевой РНК (например, мутацией G>A), у индивидуума, включающий введение эффективного количества dРНК или конструкции, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую dРНК, индивидууму, где dРНК содержит (1) нацеливающую последовательность РНК, которая гибридизуется с целевой РНК, и (2) последовательность малой ядрышковой РНК (мякРНК), связанную с 3'- и/или 5'-концами нацеливающей последовательности РНК, и где dРНК способна рекрутировать ADAR для дезаминирования целевого остатка аденозина в целевой РНК.

[201] В некоторых вариантах осуществления предложен способ лечения или предупреждения синдрома Жубер, связанного с мутацией в целевой РНК (например, мутацией G>A), у индивидуума, включающий введение эффективного количества конструкции, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую dРНК, индивидууму, где dРНК содержит нацеливающую последовательность РНК, которая гибридизуется с целевой РНК, где dРНК способна рекрутировать ADAR для дезаминирования целевого остатка аденозина в целевой РНК, и где конструкция содержит промотор полимеразы II («промотор Pol II»), функционально связанный с нуклеиновой кислотой, кодирующей dРНК.

[202] В некоторых вариантах осуществления ADAR представляет собой эндогенно экспрессируемую ADAR в клетках индивидуума. В некоторых вариантах осуществления

способ включает введение ADAR или конструкции, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую ADAR, индивидууму. В некоторых вариантах осуществления целевая РНК представляет собой  $AHII^{W725X}$  (например, 2174G>A). В некоторых вариантах осуществления dРНК содержит последовательность нуклеиновой кислоты согласно SEQ ID NO: 8.

[203] В некоторых вариантах осуществления предложен способ лечения анемии Фанкони, связанной с мутацией в целевой РНК (например, мутацией G>A), у индивидуума, включающий введение dРНК или конструкции, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую dРНК, в выделенную клетку индивидуума *ex vivo*, где dРНК содержит нацеливающую последовательность РНК, которая гибридизуется с целевой РНК, связанной с указанным заболеванием или состоянием, где dРНК способна рекрутировать ADAR для дезаминирования целевого остатка аденозина в целевой РНК, и где dРНК представляет собой кольцевую РНК или способна образовывать кольцевую РНК.

[204] В некоторых вариантах осуществления предложен способ лечения анемии Фанкони, связанной с мутацией в целевой РНК (например, мутацией G>A), у индивидуума, включающий введение dРНК или конструкции, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую dРНК, в выделенную клетку индивидуума *ex vivo*, где dРНК содержит (1) нацеливающую последовательность РНК, которая гибридизуется с целевой РНК, и (2) последовательность малой ядрышковой РНК (мякРНК), связанную с 3'- и/или 5'-концами нацеливающей последовательности РНК, и где dРНК способна рекрутировать ADAR для дезаминирования целевого остатка аденозина в целевой РНК.

[205] В некоторых вариантах осуществления предложен способ лечения анемии Фанкони, связанной с мутацией в целевой РНК (например, мутацией G>A), у индивидуума, включающий введение конструкции, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую dРНК, в выделенную клетку индивидуума *ex vivo*, где dРНК содержит нацеливающую последовательность РНК, которая гибридизуется с целевой РНК, где dРНК способна рекрутировать ADAR для дезаминирования целевого остатка аденозина в целевой РНК, и где конструкция содержит промотор полимеразы II («промотор Pol II»), функционально связанный с нуклеиновой кислотой, кодирующей dРНК.

[206] В некоторых вариантах осуществления ADAR представляет собой эндогенно экспрессируемую ADAR в выделенной клетке. В некоторых вариантах осуществления способ включает введение ADAR или конструкции, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую ADAR, в выделенную клетку. В некоторых вариантах осуществления

целевая РНК представляет собой *FANCC*<sup>W506X</sup> (например, 1517G>A). В некоторых вариантах осуществления dРНК содержит последовательность нуклеиновой кислоты согласно SEQ ID NO: 9 (5'-GCCAAUGAUCUCGUGAGUUAUCUCAGCAGUGUGAGCCA UCAGGGUGAUGACAUCCCAGGCGAUCGUGUGGCCUCCAGGAGCCCAGAGCAGGAA GUUGAGGAGAAGGUGCCU-3').

[207] В некоторых вариантах осуществления предложен способ лечения или предупреждения анемии Фанкони, связанной с мутацией в целевой РНК (например, мутацией G>A), у индивидуума, включающий введение эффективного количества dРНК или конструкции, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую dРНК, индивидууму, где dРНК содержит нацеливающую последовательность РНК, которая гибридизуется с целевой РНК, связанной с указанным заболеванием или состоянием, где dРНК способна рекрутировать ADAR для дезаминирования целевого остатка аденозина в целевой РНК, и где dРНК представляет собой кольцевую РНК или способна образовывать кольцевую РНК.

[208] В некоторых вариантах осуществления предложен способ лечения или предупреждения анемии Фанкони, связанной с мутацией в целевой РНК (например, мутацией G>A), у индивидуума, включающий введение эффективного количества dРНК или конструкции, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую dРНК, индивидууму, где dРНК содержит (1) нацеливающую последовательность РНК, которая гибридизуется с целевой РНК, и (2) последовательность малой ядрышковой РНК (мякРНК), связанную с 3'- и/или 5'-концами нацеливающей последовательности РНК, и где dРНК способна рекрутировать ADAR для дезаминирования целевого остатка аденозина в целевой РНК.

[209] В некоторых вариантах осуществления предложен способ лечения или предупреждения анемии Фанкони, связанной с мутацией в целевой РНК (например, мутацией G>A), у индивидуума, включающий введение эффективного количества конструкции, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую dРНК, индивидууму, где dРНК содержит нацеливающую последовательность РНК, которая гибридизуется с целевой РНК, где dРНК способна рекрутировать ADAR для дезаминирования целевого остатка аденозина в целевой РНК, и где конструкция содержит промотор полимеразы II («промотор Pol II»), функционально связанный с нуклеиновой кислотой, кодирующей dРНК.

[210] В некоторых вариантах осуществления ADAR представляет собой эндогенно экспрессируемую ADAR в клетках индивидуума. В некоторых вариантах осуществления способ включает введение ADAR или конструкции, содержащей нуклеиновую кислоту,

кодирующую ADAR, индивидууму. В некоторых вариантах осуществления целевая РНК представляет собой  $FANCC^{W506X}$  (например, 1517G>A). В некоторых вариантах осуществления dРНК содержит последовательность нуклеиновой кислоты согласно SEQ ID NO: 9.

[211] В некоторых вариантах осуществления предложен способ лечения первичной семейной гипертрофической кардиомиопатии, связанной с мутацией в целевой РНК (например, мутацией G>A), у индивидуума, включающий введение dРНК или конструкции, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую dРНК, в выделенную клетку индивидуума *ex vivo*, где dРНК содержит нацеливающую последовательность РНК, которая гибридизуется с целевой РНК, связанной с указанным заболеванием или состоянием, где dРНК способна рекрутировать ADAR для дезаминирования целевого остатка аденозина в целевой РНК, и где dРНК представляет собой кольцевую РНК или способна образовывать кольцевую РНК.

[212] В некоторых вариантах осуществления предложен способ лечения первичной семейной гипертрофической кардиомиопатии, связанной с мутацией в целевой РНК (например, мутацией G>A), у индивидуума, включающий введение dРНК или конструкции, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую dРНК, в выделенную клетку индивидуума *ex vivo*, где dРНК содержит (1) нацеливающую последовательность РНК, которая гибридизуется с целевой РНК, и (2) последовательность малой ядрышковой РНК (мякРНК), связанную с 3'- и/или 5'-концами нацеливающей последовательности РНК, и где dРНК способна рекрутировать ADAR для дезаминирования целевого остатка аденозина в целевой РНК.

[213] В некоторых вариантах осуществления предложен способ лечения первичной семейной гипертрофической кардиомиопатии, связанной с мутацией в целевой РНК (например, мутацией G>A), у индивидуума, включающий введение конструкции, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую dРНК, в выделенную клетку индивидуума *ex vivo*, где dРНК содержит нацеливающую последовательность РНК, которая гибридизуется с целевой РНК, где dРНК способна рекрутировать ADAR для дезаминирования целевого остатка аденозина в целевой РНК, и где конструкция содержит промотор полимеразы II («промотор Pol II»), функционально связанный с нуклеиновой кислотой, кодирующей dРНК.

[214] В некоторых вариантах осуществления ADAR представляет собой эндогенно экспрессируемую ADAR в выделенной клетке. В некоторых вариантах осуществления способ включает введение ADAR или конструкции, содержащей нуклеиновую кислоту,

кодирующую ADAR, в выделенную клетку. В некоторых вариантах осуществления целевая РНК представляет собой *MYBPC3*<sup>W1098X</sup> (например, 3293G>A). В некоторых вариантах осуществления dРНК содержит последовательность нуклеиновой кислоты согласно SEQ ID NO: 10 (5'-CAAGACGGUGAACCCACUCCAUGGUCUUCUUGUCGGCUUUCUGCACUGUGUACCCCCAGAGCUCCGUGUUGCCGACAUCCUGGGGUGGCUUCCACUCCAGAGCCACAUAAG-3').

[215] В некоторых вариантах осуществления предложен способ лечения или предупреждения первичной семейной гипертрофической кардиомиопатии, связанной с мутацией в целевой РНК (например, мутацией G>A), у индивидуума, включающий введение эффективного количества dРНК или конструкции, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую dРНК, индивидууму, где dРНК содержит нацеливающую последовательность РНК, которая гибридизуется с целевой РНК, связанной с указанным заболеванием или состоянием, где dРНК способна рекрутировать ADAR для дезаминирования целевого остатка аденозина в целевой РНК, и где dРНК представляет собой кольцевую РНК или способна образовывать кольцевую РНК.

[216] В некоторых вариантах осуществления предложен способ лечения или предупреждения первичной семейной гипертрофической кардиомиопатии, связанной с мутацией в целевой РНК (например, мутацией G>A), у индивидуума, включающий введение эффективного количества dРНК или конструкции, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую dРНК, индивидууму, где dРНК содержит (1) нацеливающую последовательность РНК, которая гибридизуется с целевой РНК, и (2) последовательность малой ядрышковой РНК (мякРНК), связанную с 3'- и/или 5'-концами нацеливающей последовательности РНК, и где dРНК способна рекрутировать ADAR для дезаминирования целевого остатка аденозина в целевой РНК.

[217] В некоторых вариантах осуществления предложен способ лечения или предупреждения первичной семейной гипертрофической кардиомиопатии, связанной с мутацией в целевой РНК (например, мутацией G>A), у индивидуума, включающий введение эффективного количества конструкции, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую dРНК, индивидууму, где dРНК содержит нацеливающую последовательность РНК, которая гибридизуется с целевой РНК, где dРНК способна рекрутировать ADAR для дезаминирования целевого остатка аденозина в целевой РНК, и где конструкция содержит промотор полимеразы II («промотор Pol II»), функционально связанный с нуклеиновой кислотой, кодирующей dРНК.

[218] В некоторых вариантах осуществления ADAR представляет собой эндогенно экспрессируемую ADAR в клетках индивидуума. В некоторых вариантах осуществления способ включает введение ADAR или конструкции, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую ADAR, индивидууму. В некоторых вариантах осуществления целевая РНК представляет собой *MYBPC3*<sup>W1098X</sup> (например, 3293G>A). В некоторых вариантах осуществления dРНК содержит последовательность нуклеиновой кислоты согласно SEQ ID NO: 10.

[219] В некоторых вариантах осуществления предложен способ лечения X-сцепленного тяжелого комбинированного иммунодефицита, связанного с мутацией в целевой РНК (например, мутацией G>A), у индивидуума, включающий введение dРНК или конструкции, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую dРНК, в выделенную клетку индивидуума *ex vivo*, где dРНК содержит нацеливающую последовательность РНК, которая гибридизуется с целевой РНК, связанной с указанным заболеванием или состоянием, где dРНК способна рекрутировать ADAR для дезаминирования целевого остатка аденозина в целевой РНК, и где dРНК представляет собой кольцевую РНК или способна образовывать кольцевую РНК.

[220] В некоторых вариантах осуществления предложен способ лечения X-сцепленного тяжелого комбинированного иммунодефицита, связанного с мутацией в целевой РНК (например, мутацией G>A), у индивидуума, включающий введение dРНК или конструкции, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую dРНК, в выделенную клетку индивидуума *ex vivo*, где dРНК содержит (1) нацеливающую последовательность РНК, которая гибридизуется с целевой РНК, и (2) последовательность малой ядрышковой РНК (мякРНК), связанную с 3'- и/или 5'-концами нацеливающей последовательности РНК, и где dРНК способна рекрутировать ADAR для дезаминирования целевого остатка аденозина в целевой РНК.

[221] В некоторых вариантах осуществления предложен способ лечения X-сцепленного тяжелого комбинированного иммунодефицита, связанного с мутацией в целевой РНК (например, мутацией G>A), у индивидуума, включающий введение конструкции, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую dРНК, в выделенную клетку индивидуума *ex vivo*, где dРНК содержит нацеливающую последовательность РНК, которая гибридизуется с целевой РНК, где dРНК способна рекрутировать ADAR для дезаминирования целевого остатка аденозина в целевой РНК, и где конструкция содержит промотор полимеразы II («промотор Pol II»), функционально связанный с нуклеиновой кислотой, кодирующей dРНК.

[222] В некоторых вариантах осуществления ADAR представляет собой эндогенно экспрессируемую ADAR в выделенной клетке. В некоторых вариантах осуществления способ включает введение ADAR или конструкции, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую ADAR, в выделенную клетку. В некоторых вариантах осуществления целевая РНК представляет собой *IL2RG*<sup>W237X</sup> (например, 710G>A). В некоторых вариантах осуществления dРНК содержит последовательность нуклеиновой кислоты согласно SEQ ID NO: 11 (5'-AGGAUUCUCUUUGAAGUAUUGCUCCCCAGUGGAUUGGGUGGCUC CAUUCACUCCAAUGCUGAGCACUCCACAGAGUGGGUAAAGCGGCUCCGAACAC GAAACGUGUA-3').

[223] В некоторых вариантах осуществления предложен способ лечения или предупреждения X-сцепленного тяжелого комбинированного иммунодефицита, связанного с мутацией в целевой РНК (например, мутацией G>A), у индивидуума, включающий введение эффективного количества dРНК или конструкции, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую dРНК, индивидууму, где dРНК содержит нацеливающую последовательность РНК, которая гибридизуется с целевой РНК, связанной с указанным заболеванием или состоянием, где dРНК способна рекрутировать ADAR для дезаминирования целевого остатка аденозина в целевой РНК, и где dРНК представляет собой кольцевую РНК или способна образовывать кольцевую РНК.

[224] В некоторых вариантах осуществления предложен способ лечения или предупреждения X-сцепленного тяжелого комбинированного иммунодефицита, связанного с мутацией в целевой РНК (например, мутацией G>A), у индивидуума, включающий введение эффективного количества dРНК или конструкции, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую dРНК, индивидууму, где dРНК содержит (1) нацеливающую последовательность РНК, которая гибридизуется с целевой РНК, и (2) последовательность малой ядрышковой РНК (мякРНК), связанную с 3'- и/или 5'-концами нацеливающей последовательности РНК, и где dРНК способна рекрутировать ADAR для дезаминирования целевого остатка аденозина в целевой РНК.

[225] В некоторых вариантах осуществления предложен способ лечения или предупреждения X-сцепленного тяжелого комбинированного иммунодефицита, связанного с мутацией в целевой РНК (например, мутацией G>A), у индивидуума, включающий введение эффективного количества конструкции, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую dРНК, индивидууму, где dРНК содержит нацеливающую последовательность РНК, которая гибридизуется с целевой РНК, где dРНК способна рекрутировать ADAR для дезаминирования целевого остатка аденозина в целевой РНК, и

где конструкция содержит промотор полимеразы II («промотор Pol II»), функционально связанный с нуклеиновой кислотой, кодирующей dPHK.

[226] В некоторых вариантах осуществления ADAR представляет собой эндогенно экспрессируемую ADAR в клетках индивидуума. В некоторых вариантах осуществления способ включает введение ADAR или конструкции, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую ADAR, индивидууму. В некоторых вариантах осуществления целевая РНК представляет собой *IL2RG*<sup>W237X</sup> (например, 710G>A). В некоторых вариантах осуществления dPHK содержит последовательность нуклеиновой кислоты согласно SEQ ID NO: 11.

[227] Как правило, дозировки, схемы и способы введения композиций (например, dPHK или конструкции, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую dPHK) 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, внутрипузырный, внутримышечный, интратрахеальный, подкожный, внутриглазной, интратекальный или трансдермальный.

[228] Способы редактирования РНК согласно настоящей заявке могут применяться не только в клетках животных, например, клетках млекопитающих, но также могут применяться для модификации РНК растений или грибов, например, у растений или грибов, которые имеют эндогенно экспрессируемые ADAR. Способы, описанные в настоящем документе, могут применяться для создания генетически модифицированных растений и грибов с улучшенными свойствами.

[229] Кроме того, предложены любая из dPHK, конструкций, клеток, имеющих отредактированную РНК, и композиций, описанных в настоящем документе, для применения в любом из способов лечения, описанных в настоящем документе, и любая из dPHK, конструкций, отредактированных клеток и композиций, описанных в настоящем документе, для производства лекарственного средства для лечения заболевания или состояния.

## **V. Композиции, наборы и изделия**

[230] В настоящем документе также предложены композиции (такие как фармацевтические композиции), содержащие любую из dPHK, конструкций, библиотек или клеток-хозяев, имеющих отредактированную РНК, как описано в настоящем документе.

[231] В некоторых вариантах осуществления предложена фармацевтическая композиция, содержащая любую из dРНК или конструкций, кодирующих dРНК, описанных в настоящем документе, 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 используемых дозировках и концентрациях и включают буферы, такие как фосфатный, цитратный, 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); низкомолекулярные (содержащие менее приблизительно 10 остатков) полипептиды; белки, такие как сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины; гидрофильные полимеры, такие как поливинилпирролидон; 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; сахара, такие как сахароза, маннит, трегалоза или сорбит; солеобразующие противоионы, такие как натрий; комплексы металлов (например, комплексы Zn-белок); и/или неионогенные поверхностно-активные вещества, такие как TWEEN™, PLURONIC™ или полиэтиленгликоль (ПЭГ). В некоторых вариантах осуществления предложены лиофилизированные препараты. Фармацевтические композиции, применяемые для введения *in vivo*, должны быть стерильными. Это легко достигается, например, фильтрацией через мембраны для стерилизующей фильтрации.

[232] Также предложены наборы, подходящие для любого из способов редактирования РНК или способов лечения, описанных в настоящем документе, содержащие любую из dРНК, конструкций, композиций, библиотек или отредактированных клеток-хозяев, как описано в настоящем документе.

[233] В некоторых вариантах осуществления предложен набор для редактирования целевой РНК в клетке-хозяине, содержащий dРНК или конструкцию, содержащую нуклеиновую кислоту, кодирующую dРНК, где dРНК содержит нацеливающую последовательность РНК, которая гибридизуется с целевой РНК, связанной с заболеванием или состоянием, где dРНК способна рекрутировать ADAR для дезаминирования целевого остатка аденозина в целевой РНК, и где dРНК представляет собой кольцевую РНК или способна образовывать кольцевую РНК.

[234] В некоторых вариантах осуществления предложен набор для редактирования целевой РНК в клетке-хозяине, содержащий dРНК или конструкцию, содержащую нуклеиновую кислоту, кодирующую dРНК, где dРНК содержит (1) нацеливающую последовательность РНК, которая гибридизуется с целевой РНК, и (2) последовательность малой ядрышковой РНК (мякРНК), связанную с 3'- и/или 5'-концами нацеливающей последовательности РНК, и где dРНК способна рекрутировать ADAR для дезаминирования целевого остатка аденозина в целевой РНК.

[235] В некоторых вариантах осуществления предложен набор для редактирования целевой РНК в клетке-хозяине, содержащий конструкцию, содержащую нуклеиновую кислоту, кодирующую dРНК, где dРНК содержит нацеливающую последовательность РНК, которая гибридизуется с целевой РНК, где dРНК способна рекрутировать ADAR для дезаминирования целевого остатка аденозина в целевой РНК, и где конструкция содержит промотор полимеразы II («промотор Pol II»), функционально связанный с нуклеиновой кислотой, кодирующей dРНК.

[236] В некоторых вариантах осуществления набор дополнительно содержит ADAR или конструкцию, содержащую нуклеиновую кислоту, кодирующую ADAR. В некоторых вариантах осуществления набор дополнительно содержит ингибитор ADAR3 или содержащую его конструкцию. В некоторых вариантах осуществления набор дополнительно содержит стимулятор интерферона или содержащую его конструкцию. В некоторых вариантах осуществления набор дополнительно содержит инструкцию по осуществлению любого из способов редактирования РНК или способов лечения, описанных в настоящем документе.

[237] Наборы согласно настоящей заявке находятся в подходящей упаковке. Подходящая упаковка включает, не ограничиваясь перечисленным, 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, среда для культивирования клеток, буферы и информация для интерпретации результатов.

[238] Таким образом, в настоящей заявке также предложены изделия. Изделие может содержать контейнер и этикетку или вкладыш в упаковку на контейнере или связанный с ним. 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 представлять собой многоразовый флакон, который обеспечивает возможность многократных введений (например, от 2-6 введений) восстановленного препарата. Вкладыш в упаковку относится к инструкциям, обычно включаемым в упаковки терапевтических продуктов для коммерческого использования, содержащим информацию о показаниях, применении, дозировке, введении, противопоказаниях и/или предупреждениях относительно применения таких продуктов. Кроме того, изделие может дополнительно содержать второй контейнер, содержащий фармацевтически приемлемый буфер, такой как бактериостатическая вода для инъекций (BWFI), натрий-фосфатный буфер, раствор Рингера и раствор декстрозы. Оно может дополнительно включать другие материалы, желательные с коммерческой точки зрения и с точки зрения пользователя, включая другие буферы, разбавители, фильтры, иглы и шприцы.

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

[240] Приведенные ниже иллюстративные варианты осуществления и примеры предназначены лишь в качестве иллюстративных для настоящей заявки, и поэтому не должны толковаться как ограничивающие изобретение каким-либо образом. Следующие ниже иллюстративные варианты осуществления, примеры и подробное описание приведены для иллюстрации, а не для ограничения.

### ИЛЛЮСТРАТИВНЫЕ ВАРИАНТЫ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ

[241] В настоящей заявке предложены следующие варианты осуществления:

1. Способ редактирования целевой РНК в клетке-хозяине, включающий введение рекрутирующей дезаминазы РНК (dРНК) или конструкции, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую dРНК, в клетку-хозяина, где:

(1) dРНК содержит нацеливающую последовательность РНК, по меньшей мере частично комплементарную целевой РНК,

(2) dРНК способна рекрутировать РНК-специфическую аденозиндезаминазу (ADAR), и

(3) dРНК представляет собой кольцевую РНК или способна образовывать кольцевую РНК.

2. Способ согласно варианту осуществления 1, где dРНК дополнительно содержит 3'-последовательность лигирования и 5'-последовательность лигирования.
3. Способ согласно варианту осуществления 2, где 3'-последовательность лигирования и 5'-последовательность лигирования по меньшей мере частично комплементарны друг другу.
4. Способ согласно варианту осуществления 2 или варианту осуществления 3, где 3'-последовательность лигирования и 5'-последовательность лигирования имеют длину от приблизительно 20 до приблизительно 75 нуклеотидов.
5. Способ по любому из вариантов осуществления 1-4, где dРНК циклизуют с помощью РНК-лигазы RtcB.
6. Способ согласно варианту осуществления 4, где РНК-лигаза RtcB эндогенно экспрессируется в клетке-хозяине.
7. Способ согласно любому из вариантов осуществления 1-6, где dРНК представляет собой кольцевую РНК.
8. Способ согласно любому из вариантов осуществления 1-6, где dРНК представляет собой линейную РНК, способную образовывать кольцевую РНК.
9. Способ согласно любому из вариантов осуществления 1-6, включающий введение конструкции, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую dРНК, в клетку-хозяина.
10. Способ согласно п. 9, где конструкция дополнительно содержит 3'-последовательность рибозима twister, связанную с 3'-концом нуклеиновой кислоты, кодирующей dРНК, и 5'-последовательность рибозима twister, связанную с 5'-концом нуклеиновой кислоты, кодирующей dРНК.
11. Способ согласно варианту осуществления 10, где 3'-последовательность twister представляет собой twister P3 U2A, и 5'-последовательность twister представляет собой twister P1.
12. Способ согласно варианту осуществления 10, где 5'-последовательность twister представляет собой twister P3 U2A, и 3'-последовательность twister представляет собой twister P1.
13. Способ редактирования целевой РНК в клетке-хозяине, включающий введение рекрутирующей дезаминазы РНК (dРНК) или конструкции, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую dРНК, в клетку-хозяина, где dРНК содержит:

(1) нацеливающую последовательность РНК, по меньшей мере частично комплементарную целевой РНК, и

(2) последовательность малой ядрышковой РНК (мякРНК), связанную с 3'- и/или 5'-концами нацеливающей последовательности РНК;

и где dРНК способна рекрутировать РНК-специфическую аденозиндезаминазу (ADAR).

14. Способ согласно варианту осуществления 13, где dРНК содержит последовательность мякРНК, связанную с 5'-концом нацеливающей последовательности РНК («5'-последовательность мякРНК»).

15. Способ согласно варианту осуществления 13 или 14, где dРНК содержит последовательность мякРНК, связанную с 3'-концом нацеливающей последовательности РНК («3'-последовательность мякРНК»).

16. Способ согласно любому из вариантов осуществления 13-15, где последовательность мякРНК имеет длину по меньшей мере приблизительно 70 нуклеотидов.

17. Способ согласно любому из вариантов осуществления 13-16, где 3'-последовательность мякРНК содержит последовательность нуклеиновой кислоты согласно SEQ ID NO: 1.

18. Способ согласно любому из вариантов осуществления 13-17, где 5'-последовательность мякРНК содержит последовательность нуклеиновой кислоты согласно SEQ ID NO: 2.

19. Способ согласно любому из вариантов осуществления 13-18, где последовательность мякРНК представляет собой последовательность C/D-бокс-мякРНК.

20. Способ согласно любому из вариантов осуществления 13-18, где последовательность мякРНК представляет собой последовательность H/ACA-бокс-мякРНК.

21. Способ согласно любому из вариантов осуществления 13-18, где последовательность мякРНК представляет собой последовательность составной C/D-бокс-и H/ACA-бокс-мякРНК.

22. Способ согласно любому из вариантов осуществления 13-18, где последовательность мякРНК представляет собой последовательность «сиротской» мякРНК.

23. Способ согласно любому из вариантов осуществления 13-22, включающий введение конструкции, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую dРНК, в клетку-хозяина.
24. Способ согласно любому из вариантов осуществления 9-12 и 23, где конструкция дополнительно содержит промотор, функционально связанный с нуклеиновой кислотой, кодирующей dРНК.
25. Способ согласно варианту осуществления 24, где промотор представляет собой промотор полимеразы II («промотор Pol II»).
26. Способ редактирования целевой РНК в клетке-хозяине, включающий введение конструкции, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую рекрутирующую дезаминазу РНК (dРНК), в клетку-хозяина, где:
- (1) dРНК содержит нацеливающую последовательность РНК, по меньшей мере частично комплементарную целевой РНК,
  - (2) dРНК способна рекрутировать РНК-специфическую аденозиндезаминазу (ADAR), и
  - (3) конструкция содержит промотор полимеразы II («промотор Pol II»), функционально связанный с нуклеиновой кислотой, кодирующей dРНК.
27. Способ согласно варианту осуществления 25 или 26, где промотор Pol II представляет собой промотор CMV.
28. Способ согласно варианту осуществления 27, где промотор CMV содержит последовательность нуклеиновой кислоты согласно SEQ ID NO: 3.
29. Способ согласно любому из вариантов осуществления 9-12 и 23-28, где конструкция представляет собой вирусный вектор или плазмиду.
30. Способ согласно варианту осуществления 29, где конструкция представляет собой вектор AAV.
31. Способ согласно любому из вариантов осуществления 1-30, где ADAR эндогенно экспрессируется клеткой-хозяином.
32. Способ согласно варианту осуществления 31, где клетка-хозяин представляет собой Т-клетку.
33. Способ согласно любому из вариантов осуществления 1-32, где нацеливающая последовательность РНК имеет длину более 50 нуклеотидов.

34. Способ согласно варианту осуществления 33, где нацеливающая последовательность РНК имеет длину от приблизительно 100 до приблизительно 150 нуклеотидов.

35. Способ согласно любому из вариантов осуществления 1-34, где нацеливающая последовательность РНК содержит цитидин, аденозин или уридин прямо напротив целевого аденозина в целевой РНК.

36. Способ согласно варианту осуществления 35, где нацеливающая последовательность РНК содержит нарушающий комплементарность цитидин прямо напротив целевого аденозина в целевой РНК.

37. Способ согласно варианту осуществления 36, где нарушающий комплементарность цитидин расположен по меньшей мере через 20 нуклеотидов от 3'-конца нацеливающей последовательности РНК и по меньшей мере через 5 нуклеотидов от 5'-конца нацеливающей последовательности РНК.

38. Способ согласно любому из вариантов осуществления 1-37, где нацеливающая последовательность РНК дополнительно содержит один или более гуанозинов, каждый из которых расположен напротив нецелевого аденозина в целевой РНК.

39. Способ согласно любому из вариантов осуществления 1-38, где нацеливающая последовательность РНК содержит два или более последовательных нарушающих комплементарность нуклеотидов напротив нецелевого аденозина в целевой РНК.

40. Способ согласно любому из вариантов осуществления 1-39, где ближайший сосед целевого аденозина с 5'-конца в целевой РНК представляет собой нуклеотид, выбранный из U, C, A и G с предпочтением  $U > C \approx A > G$ , и ближайший сосед целевого аденозина с 3'-конца в целевой РНК представляет собой нуклеотид, выбранный из G, C, A и U с предпочтением  $G > C > A \approx U$ .

41. Способ согласно любому из вариантов осуществления 1-40, 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.

42. Способ согласно варианту осуществления 41, где мотив из трех оснований представляет собой UAG, и где нацеливающая РНК содержит A, расположенный прямо напротив уридина в мотиве из трех оснований, цитидин, расположенный прямо напротив целевого аденозина, и цитидин, гуанозин или уридин, расположенный прямо напротив гуанозина в мотиве из трех оснований.

43. Способ согласно любому из вариантов осуществления 1-42, где целевая РНК представляет собой РНК, выбранную из группы, состоящей из прематричной РНК, матричной РНК, рибосомной РНК, транспортной РНК, длинной некодирующей РНК и малой РНК.
44. Способ согласно варианту осуществления 43, где целевая РНК представляет собой прематричную РНК.
45. Способ согласно любому из вариантов осуществления 1-44, дополнительно включающий введение ингибитора ADAR3 и/или в клетку-хозяина.
46. Способ согласно любому из вариантов осуществления 1-45, дополнительно включающий введение стимулятора интерферона в клетку-хозяина.
47. Способ согласно любому из вариантов осуществления 1-46, включающий введение множества dРНК или конструкций, каждая из которых нацелена на отличающуюся целевую РНК.
48. Способ согласно любому из вариантов осуществления 1-47, где эффективность редактирования целевой РНК составляет по меньшей мере 40%.
49. Способ согласно любому из вариантов осуществления 1-48, где конструкция или dРНК не вызывает иммунный ответ.
50. Способ согласно любому из вариантов осуществления 1-49, дополнительно включающий введение ADAR (например, экзогенной ADAR) в клетку-хозяина.
51. Способ согласно варианту осуществления 50, где ADAR представляет собой ADAR1, содержащую мутацию E1008.
52. Способ согласно любому из вариантов осуществления 1-51, где дезаминирование целевого аденозина в целевой РНК приводит к миссенс-мутации, раннему стоп-кодону, абберрантному сплайсингу или альтернативному сплайсингу в целевой РНК, или реверсии миссенс-мутации, раннего стоп-кодона, абберрантного сплайсинга или альтернативного сплайсинга в целевой РНК.
53. Способ согласно варианту осуществления 52, где дезаминирование целевого аденозина в целевой РНК приводит к точечной мутации, усечению, удлинению и/или неправильной укладке белка, кодируемого целевой РНК, или к образованию функционального, полноразмерного, правильно уложенного белка и/или белка дикого типа посредством реверсии миссенс-мутации, раннего стоп-кодона, абберрантного сплайсинга или альтернативного сплайсинга в целевой РНК.

54. Способ согласно любому из вариантов осуществления 1-53, где клетка-хозяин представляет собой эукариотическую клетку.
55. Способ согласно варианту осуществления 54, где клетка-хозяин представляет собой клетку млекопитающего.
56. Способ согласно варианту осуществления 55, где клетка-хозяин представляет собой человеческую или мышиную клетку.
57. Отредактированная РНК или клетка-хозяин, имеющая отредактированную РНК, полученные способом согласно любому из вариантов осуществления 1-56.
58. Способ лечения или предупреждения заболевания или состояния у индивидуума, включающий редактирование целевой РНК, связанной с указанным заболеванием или состоянием, в клетке индивидуума в соответствии со способом согласно любому из вариантов осуществления 1-57.
59. Способ согласно варианту осуществления 58, где заболевание или состояние представляет собой наследственное генетическое заболевание, или заболевание или состояние, связанное с одной или более приобретенными генетическими мутациями.
60. Способ согласно варианту осуществления 58 или 59, где целевая РНК имеет мутацию G в A.
61. Способ согласно любому из вариантов осуществления 58-60, где заболевание или состояние представляет собой моногенное заболевание или состояние.
62. Способ согласно любому из вариантов осуществления 58-61, где заболевание или состояние представляет собой полигенное заболевание или состояние.
63. Способ согласно любому из вариантов осуществления 58-62, 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 (МПС 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 Жубер;

- (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 семейную гипертрофическую кардиомиопатию; или
- (vii) целевая РНК представляет собой *IL2RG*, и заболевание или состояние представляет собой X-сцепленный тяжелый комбинированный иммунодефицит.
64. Рекрутирующая дезаминаза РНК (dРНК) для редактирования целевой РНК, содержащая нацеливающую последовательность РНК, по меньшей мере частично комплементарную целевой РНК, где dРНК способна рекрутировать РНК-специфическую аденозиндезаминазу (ADAR), и где dРНК является кольцевой или способна образовывать кольцевую РНК.
65. dРНК согласно варианту осуществления 64, где dРНК дополнительно содержит 3'-последовательность лигирования и 5'-последовательность лигирования.
66. dРНК согласно варианту осуществления 65, где 3'-последовательность лигирования и 5'-последовательность лигирования по меньшей мере частично комплементарны друг другу.
67. dРНК согласно варианту осуществления 65 или 66, где 3'-последовательность лигирования и 5'-последовательность лигирования имеют длину от приблизительно 20 до приблизительно 75 нуклеотидов.
68. dРНК согласно любому из вариантов осуществления 64-67, где dРНК представляет собой кольцевую РНК.
69. dРНК согласно любому из вариантов осуществления 64-67, где dРНК представляет собой линейную РНК, способную образовывать кольцевую РНК.
70. Конструкция, содержащая нуклеиновую кислоту, кодирующую dРНК согласно любому из вариантов осуществления 64-69.
71. Конструкция согласно варианту осуществления 70, дополнительно содержащая 3'-последовательность рибозима *twister*, связанную с 3'-концом нуклеиновой кислоты, кодирующей dРНК, и 5'-последовательность рибозима *twister*, связанную с 5'-концом нуклеиновой кислоты, кодирующей dРНК.

72. Конструкция согласно варианту осуществления 71, где 3'-последовательность twister представляет собой twister P3 U2A, и 5'-последовательность twister представляет собой twister P1.

73. Конструкция согласно варианту осуществления 72, где 5'-последовательность twister представляет собой twister P3 U2A, и 3'-последовательность twister представляет собой twister P1.

74. Рекрутирующая дезаминаза РНК (dРНК) для редактирования целевой РНК, содержащая:

(1) нацеливающую последовательность РНК, по меньшей мере частично комплементарную целевой РНК, и

(2) последовательность малой ядрышковой РНК (мякРНК) на 3'- и/или 5'-концах нацеливающей последовательности РНК;

где dРНК способна рекрутировать РНК-специфическую аденозиндезаминазу (ADAR).

75. dРНК согласно варианту осуществления 74, содержащая последовательность мякРНК, связанную с 5'-концом нацеливающей последовательности РНК («5'-последовательность мякРНК»).

76. dРНК согласно варианту осуществления 75, содержащая последовательность мякРНК, связанную с 3'-концом нацеливающей последовательности РНК («3'-последовательность мякРНК»).

77. dРНК согласно любому из вариантов осуществления 74-76, где последовательность мякРНК имеет длину по меньшей мере приблизительно 70 нуклеотидов.

78. dРНК согласно любому из вариантов осуществления 76-77, где 3'-последовательность мякРНК содержит последовательность нуклеиновой кислоты согласно SEQ ID NO: 1.

79. dРНК согласно любому из вариантов осуществления 75-78, где 5'-последовательность мякРНК содержит последовательность нуклеиновой кислоты согласно SEQ ID NO: 2.

80. dРНК согласно любому из вариантов осуществления 74-79, где последовательность мякРНК представляет собой последовательность C/D-бокс-мякРНК.

81. dРНК согласно любому из вариантов осуществления 74-79, где последовательность мякРНК представляет собой последовательность H/ACA-бокс-мякРНК.

82. dРНК согласно любому из вариантов осуществления 74-79, где последовательность мякРНК представляет собой последовательность составной C/D-бокс- и H/АСА-бокс-мякРНК.

83. dРНК согласно любому из вариантов осуществления 74-79, где последовательность мякРНК представляет собой последовательность «сиротской» мякРНК.

84. Конструкция, содержащая нуклеиновую кислоту, кодирующую dРНК согласно любому из вариантов осуществления 74-83.

85. Конструкция согласно любому из вариантов осуществления 70-73 и 84, дополнительно содержащая промотор, функционально связанный с нуклеиновой кислотой, кодирующей dРНК.

86. Конструкция согласно варианту осуществления 85, где промотор представляет собой промотор полимеразы II («промотор Pol II»).

87. Конструкция, содержащая нуклеиновую кислоту, кодирующую рекрутирующую дезаминазу РНК (dРНК) в клетке-хозяине, где:

(1) dРНК содержит нацеливающую последовательность РНК, по меньшей мере частично комплементарную целевой РНК,

(2) dРНК способна рекрутировать РНК-специфическую аденозиндезаминазу (ADAR), и

(3) конструкция содержит промотор полимеразы II («промотор Pol II»), функционально связанный с нуклеиновой кислотой, кодирующей dРНК.

88. Конструкция согласно варианту осуществления 86 или 87, где промотор Pol II представляет собой промотор CMV.

89. Конструкция согласно варианту осуществления 88, где промотор CMV содержит последовательность нуклеиновой кислоты согласно SEQ ID NO: 3.

90. Конструкция согласно любому из вариантов осуществления 70-73 и 84-89, представляющая собой вирусный вектор или плазмиду.

91. Конструкция согласно варианту осуществления 90, представляющая собой вектор AAV.

92. Конструкция или dРНК согласно любому из вариантов осуществления 64-91, где целевая РНК представляет собой РНК, выбранную из группы, состоящей из прематричной

РНК, матричной РНК, рибосомной РНК, транспортной РНК, длинной некодирующей РНК и малой РНК.

93. Клетка-хозяин, содержащая конструкцию или dРНК согласно любому из вариантов осуществления 64-91.

94. Набор для редактирования целевой РНК в клетке-хозяине, содержащий конструкцию или dРНК согласно любому из вариантов осуществления 64-91.

## ПРИМЕР

### *Материалы и методы*

#### Конструирование плазмид

[242] Репортер с двойной флуоресценцией клонировали с помощью ПЦР-амплификации ДНК, кодирующей mCherry и EGFP (первый кодон EGFP, ATG, был удален), линкер 3×GS и нацеливающую последовательность ДНК добавляли с помощью праймеров во время ПЦР. Затем продукты ПЦР расщепляли и связывали рестрикционным ферментом типа IIs BsmB1 (Thermo) и ДНК-лигазой T4 (NEB), которые затем вставляли в остов pLenti (pLenti-CMV-MCS-SV-Bsd, лаборатория Stanley Cohen, Стэнфордский Университет).

[243] ДНК dLbuCas13 амплифицировали с помощью ПЦР из плазмид Lbu (Addgene № 83485). ADAR1DD и ADAR2DD амплифицировали из кДНК Adar1(p150) и кДНК Adar2, обе из которых были подарены лабораторией Han из Сямыньского университета. ADAR1DD или ADAR2DD сливали с ДНК dLbuCas13 с помощью ПЦР с перекрывающимися праймерами, и слитые продукты ПЦР вставляли в остов pLenti.

[244] Для экспрессии dРНК в клетках млекопитающих последовательности dРНК синтезировали напрямую (для коротких dРНК) и отжигали или амплифицировали с помощью ПЦР путем синтеза перекрывающейся оцДНК, и клонировали продукты в соответствующие векторы при экспрессии под контролем U6 с помощью клонирования методом Golden Gate (метод «золотых ворот»).

[245] Полноразмерные Adar1(p110) и Adar1(p150) амплифицировали с помощью ПЦР из кДНК Adar1(p150), а полноразмерные Adar2 амплифицировали с помощью ПЦР из кДНК Adar2, после чего клонировали их в остов pLenti, соответственно.

[246] Для двух версий репортеров с двойной флуоресценцией (Репортер-1 и -3) кодирующие последовательности *mCherry* и *EGFP* (стартовый кодон EGFP, ATG, был

удален) амплифицировали с помощью ПЦР, расщепляли с использованием BsmBI (Thermo Fisher Scientific, ER0452) с последующим лигированием, опосредованным ДНК-лигазой T4 (NEB, M0202L), с линкерами GGGGS. Затем продукт лигирования вставляли в остов pLenti-CMV-MCS-PURO.

[247] Для получения конструкции, экспрессирующей dLbuCas13-ADAR<sub>DD</sub> (E1008Q), ген ADAR1<sub>DD</sub> амплифицировали из конструкции ADAR1<sup>p150</sup> (подарок лаборатории Jiahuai Han, Сямыньский университет). Ген dLbuCas13 амплифицировали с помощью ПЦР из плазмиды Lbu\_C2c2\_R472A\_H477A\_R1048A\_H1053A (Addgene № 83485). ADAR1<sub>DD</sub> (высокоактивный вариант E1008Q) генерировали с помощью ПЦР с перекрывающимися праймерами, а затем сливали с dLbuCas13. Продукты лигирования вставляли в остов pLenti-CMV-MCS-BSD.

[248] Для получения конструкции, экспрессирующей агРНК, последовательности агРНК синтезировали и клонировали методом Golden Gate в остов pLenti-sgRNA-lib 2.0 (Addgene № 89638), где транскрипция агРНК находилась под контролем промотора hU6. Для получения конструкций, экспрессирующих ADAR, полноразмерные ADAR1<sup>p110</sup> и ADAR1<sup>p150</sup> амплифицировали с помощью ПЦР из конструкции ADAR1<sup>p150</sup>, а полноразмерный ADAR2 амплифицировали с помощью ПЦР из конструкции ADAR2 (подарок лаборатории Jiahuai Han, Сямыньский университет). Затем амплифицированные продукты клонировали в остов pLenti-CMV-MCS-BSD.

[249] Для получения конструкций, экспрессирующих гены с патогенными мутациями, полноразмерные кодирующие последовательности *TP53* (заказанные у Vigenebio) и других 6 генов, связанных с заболеваниями (*COL3A1*, *BMPR2*, *AHI1*, *FANCC*, *MYBPC3* и *IL2RG*, подарки лаборатории Jianwei Wang, Институт биологии патогенов, Китайская академия медицинских наук), амплифицировали из конструкций, кодирующих соответствующие гены, с введением мутаций G>A с помощью мутагенной ПЦР. Амплифицированные продукты клонировали в остов pLenti-CMV-MCS-mCherry с помощью клонирования методом Гибсона.

#### Линии клеток млекопитающих и культура клеток

[250] Линии клеток млекопитающих культивировали в среде Игла, модифицированной Дульбекко (10-013-CV, Corning, Тьюксбери, Массачусетс, США), с добавлением 10% фетальной телячьей сыворотки (Lanzhou Bailing Biotechnology Co., Ltd., Ланьчжоу, Китай) с добавлением 1% пенициллин-стрептомицина в атмосфере 5% CO<sub>2</sub> при 37 °C. Линия клеток Adar1-KO была приобретена у EdiGene China, и результаты генотипирования были также предоставлены EdiGene China.

[251] Линии клеток HeLa и B16 были получены из лаборатории Z. Jiang (Пекинский университет), а линия клеток HEK293T была получена из лаборатории C. Zhang (Пекинский университет). Линия клеток RD была получена из лаборатории J Wang (Институт биологии патогенов, Пекинский объединенный медицинский колледж и Китайская академия медицинских наук). Линии клеток SF268 были получены из Клеточного центра Института фундаментальных медицинских наук Китайской академии медицинских наук. Линии клеток A549 и SW13 были получены от EdiGene Inc. Линии клеток HepG2, HT29, NIH3T3 и MEF поддерживались в лаборатории авторов изобретения в Пекинском университете. Эти линии клеток млекопитающих культивировали в среде Игла, модифицированной Дульбекко (Corning, 10-013-CV), с 10% фетальной телячьей сыворотки (CellMax, SA201.02), с дополнительной добавкой 1% пенициллин-стрептомицина в атмосфере 5% CO<sub>2</sub> при 37 °C. Если не указано иное, клетки трансфицировали реагентом для трансфекции ДНК X-tremeGENE HP (Roche, 06366546001) в соответствии с инструкциями производителя.

[252] Первичные легочные фибробласты человека (№ 3300) и первичные бронхиальные эпителиальные клетки человека (№ 3210) были приобретены у ScienCell Research Laboratories, Inc. и культивированы в среде для фибробластов (ScienCell, № 2301) и среде для бронхиальных эпителиальных клеток (ScienCell, № 3211), соответственно. В обе среды добавляли 15% фетальной телячьей сыворотки (BI) и 1% пенициллин-стрептомицина. Первичные клетки GM06214 и GM01323 были заказаны в Институте медицинских исследований Кориелла и культивированы в среде Игла, модифицированной Дульбекко (Corning, 10-013-CV), с 15% фетальной телячьей сыворотки (BI) и 1% пенициллин-стрептомицина. Все клетки культивировали в атмосфере 5% CO<sub>2</sub> при 37 °C.

#### Трансфекция репортерной системой, анализ методом FACS и секвенирование по Сэнгеру

[253] Для экспериментов по редактированию репортера с двойной флуоресценцией клетки 293T-WT (дикого типа) или клетки 293T-Adar1-KO высевали в 6-луночные планшеты ( $6 \times 10^5$  клеток/лунку), через 24 часа котрансфицировали 1,5 мкг репортерных плазмид и 1,5 мкг плазмид с dPHK с помощью реагента для трансфекции ДНК X-tremeGENE HP (06366546001; Roche, Мангейм, Германия) в соответствии с протоколами поставщика. Через 48-72 часа клетки собирали и проводили анализ методом FACS. Для дополнительного подтверждения редактирования мРНК репортера авторы изобретения отсортировали EGFP-положительные клетки из клеток 293T-WT, трансфицированных репортерными плазмидами и плазмидами с dPHK, с помощью проточного цитометра для FACS Aria (BD Biosciences), с последующим выделением тотальной РНК (TIANGEN,

DP430). Затем РНК подвергали обратной транскрипции в кДНК с помощью ОТ-ПЦР (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.

[254] Для экспериментов по реверсии Adar1(p110), Adar1(p150) или Adar2 и сверхэкспрессии клетки 293T-WT или клетки 293T-Adar1-КО высевали в 12-луночные планшеты ( $2,5 \times 10^5$  клеток/лунку), через 24 часа котрансфицировали 0,5 мкг репортерных плазмид, 0,5 мкг плазмид с dРНК и 0,5 мкг плазмид с Adar1/2 (остов pLenti в качестве контроля) с помощью реагента для трансфекции ДНК X-tremeGENE HP (06366546001, Roche, Мангейм, Германия). Через 48-72 часа клетки собирали и проводили анализ методом FACS.

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

#### Выделение и культивирование первичных человеческих Т-клеток

[256] Первичные человеческие Т-клетки выделяли из продуктов лейкофереза от здорового донора-человека. Вкратце, выделяли мононуклеарные клетки периферической крови (МНПК) с помощью центрифугирования на Ficoll (Dakewei, AS1114546), и выделяли из МНПК Т-клетки с помощью отрицательной магнитной сепарации с использованием набора EasySep Human T Cell Isolation Kit (STEMCELL, 17951). После выделения Т-клетки культивировали в среде X-vivo15, 10% FBS и IL-2 (1000 ЕД/мл) и стимулировали DynaBeads к CD3/CD28 (ThermoFisher, 11131D) в течение 2 дней. Продукты лейкофереза от здоровых доноров были приобретены у AllCells LLC China. Все здоровые доноры предоставили информированное согласие.

#### Упаковка в лентивирус и конструирование репортерных линий клеток

[257] Экспрессионную плазмиду котрансфицировали в клетки HEK293T-WT вместе с двумя вирусными пакующими плазмидами, pR8.74 и pVSVG (Addgene), с помощью реагента для трансфекции ДНК X-tremeGENE HP. Через 72 часа супернатант вируса собирали и хранили при  $-80^{\circ}\text{C}$ . Клетки HEK293T-WT инфицировали лентивирусом, через

72 часа mCherry-положительные клетки отсортировывали методом FACS и культивировали для отбора линий из одного клона клеток, стабильно экспрессирующих репортерную систему с двойной флуоресценцией с как можно более низким фоновым значением EGFP, методом предельных разведений.

[258] Для получения стабильных репортерных линий клеток репортерные конструкции (остов pLenti-CMV-MCS-PURO) котрансфицировали в клетки HEK293T вместе с двумя вирусными пакующими плазмидами, pR8.74 и pVSVG. Через 72 часа супернатант вируса собирали и хранили при -80 °C. Клетки HEK293T инфицировали лентивирусом, затем mCherry-положительные клетки отсортировывали методом FACS и культивировали для отбора линий из одного клона клеток, стабильно экспрессирующих репортерную систему с двойной флуоресценцией без обнаружимого фона EGFP. Линии клеток *ADAR1*<sup>-/-</sup> и *TP53*<sup>-/-</sup> HEK293T были созданы в соответствии с ранее описанным методом<sup>60</sup>. Нацеленную на ADAR1 sgPНК (одинокочная гидовая PНК) и ПЦР-амплифицированную донорскую ДНК, содержащую ген устойчивости к пуромицину под контролем CMV, котрансфицировали в клетки HEK293T. Затем через 7 дней после трансфекции клетки обрабатывали пуромицином. Отдельные клоны выделяли из устойчивых к пуромицину клеток с последующей проверкой посредством секвенирования и вестерн-блоттинга.

#### Редактирование PНК эндогенно или экзогенно экспрессируемых транскриптов

[259] Для оценки редактирования PНК на репортере с двойной флуоресценцией клетки HEK293T или клетки *ADAR1*<sup>-/-</sup> HEK293T высевали в 6-луночные планшеты ( $6 \times 10^5$  клеток/лунку). Через 24 часа клетки котрансфицировали 1,5 мкг репортерных плазмид и 1,5 мкг плазмид с агPНК. Чтобы изучить эффект экспрессии белков ADAR1<sup>p110</sup>, ADAR1<sup>p150</sup> или ADAR2, оценивали эффективность редактирования с помощью соотношения положительности на EGFP и глубокого секвенирования.

[260] Клетки *ADAR1*<sup>-/-</sup> HEK293T высевали в 12-луночные планшеты ( $2,5 \times 10^5$  клеток/лунку). Через 24 часа клетки котрансфицировали посредством 0,5 мкг репортерных плазмид, 0,5 мкг плазмид с агPНК и 0,5 мкг плазмид с ADAR1/2 (остов pLenti в качестве контроля). Эффективность редактирования оценивали с помощью соотношения положительности на EGFP и глубокого секвенирования.

[261] Для оценки редактирования PНК на эндогенных транскриптах мPНК клетки HEK293T высевали в 6-луночные планшеты ( $6 \times 10^5$  клеток/лунку). Через 24 часа клетки трансфицировали 3 мкг плазмид с агPНК. Эффективность редактирования оценивали с помощью глубокого секвенирования.

[262] Для оценки эффективности редактирования РНК в нескольких линиях клеток в 12-луночные планшеты высевали  $8-9 \times 10^4$  (RD, SF268, HeLa) или  $1,5 \times 10^5$  клеток (HEK293T). Для трудно трансфицируемых клеток, таких как HT29, A549, HepG2, SW13, NIH3T3, MEF и B16, в 6-луночный планшет высевали  $2-2,5 \times 10^5$  клеток. Через 24 часа эти клетки котрансфицировали репортерами и плазмидой с агРНК. Эффективность редактирования оценивали по соотношению положительности на EGFP.

[263] Для оценки соотношения положительности на EGFP через 48-72 часа после трансфекции клетки сортировали и собирали с помощью анализа методом сортировки клеток с активированной флуоресценцией (FACS). Сигнал mCherry служил в качестве флуоресцентного маркера отбора для репортерных/экспрессирующих агРНК клеток, и процентную долю  $EGFP^+/mCherry^+$  клеток рассчитывали как показатель эффективности редактирования.

[264] Для количественной оценки с помощью NGS (секвенирования нового поколения) степени редактирования A в I через 48-72 часа после трансфекции клетки сортировали и собирали с помощью анализа методом FACS, а затем подвергали выделению РНК (TIANGEN, DP420). Затем тотальные РНК подвергали обратной транскрипции в кДНК с помощью ОТ-ПЦР (TIANGEN, KR103-04), и целевой locus амплифицировали с помощью ПЦР с соответствующими праймерами, перечисленными в следующей таблице.

| Название праймера | Последовательность (5'--->3')                                                |
|-------------------|------------------------------------------------------------------------------|
| mCherry-SpeI-F    | TATAACTAGTATGGTGAGCAAGGGCGAGGAG<br>(SEQ ID NO: 12)                           |
| mCherry-BsmBI-R1  | TATACGTCTCATCTACAGATTCTTCCGGCGTGTATACCTTC<br>(SEQ ID NO: 13)                 |
| EGFP-BsmBI-F1     | TATACGTCTCATAGAGATCCCCGGTCGCCACCGTGAGCAAGG<br>GCGAGGAGCTG<br>(SEQ ID NO: 14) |

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

#### Тестирование на нескольких линиях клеток

[266] Помимо клеток HEK293T (положительный контроль) и ADAR1<sup>-/-</sup> HEK293T (отрицательный контроль), для проведения эксперимента были отобраны одна линия мышинных клеток (NIH3T3), а также семь линий человеческих клеток (RD, HeLa, SF268, A549, HepG2, HT-29, SW13) из разных тканей и органов. Для линий клеток с более

высокой эффективностью трансфекции в каждую лунку 12-луночного планшета высевали приблизительно  $8-9 \times 10^4$  клеток (RD, HeLa, SF268) или  $1,5 \times 10^5$  клеток (HEK293T), а для трудно трансфицируемых (A549, HepG2, HT-29, SW13, NIH3T3)  $2-2,5 \times 10^5$  клеток высевали в 6-луночный планшет. И все эти клетки поддерживали в среде Игла, модифицированной Дульбекко (DMEM, Corning), с добавлением 10% фетальной телячьей сыворотки (FBS, CellMax) с 5% CO<sub>2</sub> при 37 °C. Через 24 часа репортер CG2 и плазмиду с 71-нт 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, авторы изобретения увеличили общее количество клеток для анализа методом FACS до  $1 \times 10^5$  для тех клеток, которые были посеяны в 6-луночный планшет.

**Пример 1. Оптимизация LEAPER с использованием промотора CMV для управления экспрессией arPHK**

[267] Чтобы проверить, может ли РНК-полимераза II (Pol II) повысить эффективность редактирования, была сконструирована плазида, экспрессирующая arPHK под контролем промотора Pol II (CMV). Используя репортерную систему, основанную на экспрессии EGFP (Репортер 1, ФИГ. 4В), сравнивали эффективность редактирования РНК для arPHK под контролем промоторов CMV и U6 (arPHK<sub>51</sub>). Необработанные клетки использовали в качестве имитационного контроля (Имитация). Клетки, трансфицированные ненацеливающей РНК, также использовали в качестве контроля (контр РНК). Было обнаружено, что CMV-arPHK превосходит U6-arPHK в отношении редактирования РНК (ФИГ. 1).

| Название праймера        | Последовательность (5'--->3')                                                                                                                                                      |
|--------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Контр РНК <sub>51</sub>  | UAAACCGAGGGAUCAUAGGGGACUGAAUCCACCAUUCUUCU<br>CCCAAUCCCU (SEQ ID NO: 15)                                                                                                            |
| Контр РНК <sub>151</sub> | ACUACAGUUGCUCCGAUAUUUAGGCUACGUCAAUAGGCACU<br>AACUUAUUGGCGCUGGUGAACGGACUUCCUCUCGAGUACCA<br>GAAGAUGACUACAAAACUCCUUCCAUUGCGAGUAUCGGAG<br>UCUGGCUCAGUUUGGCCAGGGAGGCACU (SEQ ID NO: 16) |
| arPHK <sub>51</sub>      | GCCCTTGCTCACTGGCAGAGCCCTCCAGCATCGCGAGCAGGC<br>GCTGCCTCC (SEQ ID NO: 17)                                                                                                            |
| arPHK <sub>151</sub>     | ACUACAGUUGCUCCGAUAUUUAGGCUACGUCAAUAGGCACU<br>AACUUAUUGGCGCUGGUGAACGGACUUCCUCUCGAGUACCA<br>GAAGAUGACUACAAAACUCCUUCCAUUGCGAGUAUCGGAG<br>UCUGGCUCAGUUUGGCCAGGGAGGCACU (SEQ ID NO: 18) |

**Пример 2. Редактирование РНК, опосредованное мяк-агРНК**

[268] Чтобы стабилизировать агРНК и улучшить их ядерную локализацию, была сконструирована агРНК, имеющая концы с мякРНК. 151-нуклеотидная агРНК, нацеленная на флуоресцентный Репортер-1, была фланкирована концами с мяРНК (**ФИГ. 2А**):

5'-конец:

GAGTGAGATCTTGGACCAATGATGACTTCCATACATGCATTCCTTGGAAGCTGAAC  
AAAATGAGTGGGAACTCTGТАCTATCATCTTAGTTGAACTGAGGTCCACCGGGGGCT  
AA (SEQ ID NO: 19);

3'-конец:

AAGATTGTGTGTGGATCGATGATGACTTCCATATATACATTCCTTGGAAGCTGAAC  
AAAATGAGTGAAACTCTATACCGTCATTCTCGTCGAACTGAGGTCCAGCACATTAC  
TCCAACAG (SEQ ID NO: 20),

и была названа мяк-агРНК151.

[269] Репортер-1 с двойной флуоресценцией содержит последовательность mCherry (SEQ ID NO: 21), последовательность, содержащую линкер 3×GS и целевой А (SEQ ID NO: 22), и последовательность eGFP (SEQ ID NO: 23).

ATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGGATAACATGGCCATCATCAAGGAGTTCATGCGCTT  
CAAGGTGCACATGGAGGGCTCCGTGAACGGCCACGAGTTCGAGATCGAGGGCGAGG  
GCGAGGGCCGCCCCTACGAGGGCACCCAGACCGCCAAGCTGAAGGTGACCAAGGGT  
GGCCCCCTGCCCTTCGCCTGGGACATCCTGTCCCCTCAGTTCATGTACGGCTCCAAG  
GCCTACGTGAAGCACCCCGCCGACATCCCCGACTACTTGAAGCTGTCCTTCCCCGAG  
GGCTTCAAGTGGGAGCGCGTGATGAACTTCGAGGACGGCGGCGTGGTGACCGTGAC  
CCAGGACTCCTCCCTGCAGGACGGCGAGTTCATCTACAAGGTGAAGCTGCGCGGCA  
CCAACCTCCCCTCCGACGGCCCCGTAATGCAGAAGAAGACCATGGGCTGGGAGGCC  
TCCTCCGAGCGGATGTACCCCGAGGACGGCGCCCTGAAGGGCGAGATCAAGCAGAG  
GCTGAAGCTGAAGGACGGCGGCCACTACGACGCTGAGGTCAAGACCACCTACAAGG  
CCAAGAAGCCCGTGCAGCTGCCCCGGCGCCTACAACGTCAACATCAAGTTGGACATC  
ACCTCCCACAACGAGGACTACACCATCGTGGAACAGTACGAACGCGCCGAGGGCCG  
CCTCCACCGGCGGCATGGACGAGCTGTACAAG (последовательность mCherry)  
(SEQ ID NO: 21)

CTGCAGGGCGGAGGAGGCAGCGGCGGAGGAGGCAGCGGCGGAGGAGGCAGCAGAA  
GGTATACACGCCGGAAGAATCTGTAGAGATCCCCGGTCGCCACC

(последовательность, содержащая линкер 3×GS (выделен курсивом и жирным шрифтом) и целевой A (показан как A, выделенный более крупным и жирным шрифтом)) (SEQ ID NO: 22)

GTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACCGGGGTGGTGCCCATCCTGGTTCGAGCTGGA  
CGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCA  
CCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCCGTGCCCT  
GGCCCACCCTCGTGACCACCCTGACCTACGGCGTGCAGTGCTTCAGCCGCTACCCCG  
ACCACATGAAGCAGCACGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCCGAAGGCTACGTCCAG  
GAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAA  
GTTCGAGGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGG  
AGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACACTACAACAGCCACAACGTC  
TATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAACTTCAAGATCCGCCA  
CAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCCA  
TCGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCCGACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCGCCC  
TGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCCTGCTGGAGTTCGTGACC  
GCCGCCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGTAA (последовательность  
eGFP) (SEQ ID NO: 23).

[270] Затем мяг-агРНК<sub>151</sub>, агРНК<sub>151</sub>, мяг-контр РНК<sub>151</sub> или контр РНК<sub>151</sub> под контролем человеческого U6 трансфицировали в клетки НЕК293Т вместе с Репортер-экспрессирующими плазмидами. Через сорок восемь часов после трансфекции количественно оценивали уровень положительности на EGFP с помощью анализа методом FACS. Результаты FACS показали, что мяг-агРНК<sub>151</sub>, фланкированная концами с мягРНК, могла опосредовать направленное редактирование РНК в отношении мРНК Репортера с уровнем положительности на EGFP почти 38%, что ниже, чем у линейных агРНК (**ФИГ. 2В-2С**).

[271] Чтобы проверить, стабилизируют ли агРНК концы с мягРНК, в разных временных точках измеряли уровень положительности на EGFP. Мяг-агРНК<sub>151</sub>, агРНК<sub>151</sub>, мяг-контр РНК<sub>151</sub> или контр РНК<sub>151</sub> под контролем человеческого промотора U6 трансфицировали в клетки НЕК293Т-Репортер. Уровень положительности на EGFP измеряли в 3 временных точках: 3 дня, 6 дней и 12 дней после трансфекции. Результаты показали, что мяг-агРНК демонстрировала более высокую эффективность редактирования, чем агРНК, в течение длительного периода времени, что указывает на то,

что концы с мягРНК могут защищать агРНК от деградации и увеличивать содержание мяг-агРНК (ФИГ. 3А).

[272] Для дальнейшего повышения уровня экспрессии агРНК для экспрессии агРНК или мяг-агРНК использовали сильный вирусный промотор – CMV. Результаты показали, что агРНК, экспрессируемая под контролем промотора CMV (CMV\_агРНК), демонстрировала гораздо более высокую эффективность редактирования, чем агРНК, экспрессируемая под контролем промотора U6 (U6\_агРНК). Кроме того, уровень положительности на EGFP группы U6\_агРНК снижался с увеличением времени, в то время как уровень положительности на EGFP CMV\_агРНК все еще возрастал через 6 дней после трансфекции. Аналогичным образом мяг-агРНК, экспрессируемая под контролем промотора CMV (CMV\_мяг-агРНК), достигала гораздо более высокой эффективности редактирования, чем мяг-агРНК, экспрессируемая под контролем промотора U6 (U6\_мяг-агРНК) (ФИГ. 3В и ФИГ. 3С).

[273] На основании приведенных выше результатов было продемонстрировано, что концы с мягРНК могут стабилизировать агРНК, а агРНК или мяг-агРНК под контролем промотора CMV могут иметь повышенный уровень экспрессии. Обе эти стратегии могут значительно повысить эффективность редактирования агРНК.

### **Пример 3. Редактирование РНК, опосредованное кольцевой агРНК**

[274] Клетки НЕК293Т, стабильно экспрессирующие Репортер-1, содержащие внутрирамочный стоп-кодон между mCherry и EGFP (ФИГ. 4В), трансфицировали плазмидами, экспрессирующими кольцевую агРНК<sub>71</sub> и кольцевую агРНК<sub>111</sub>, каждая из которых была нацелена на Репортер-1. Флуоресценция EGFP свидетельствует об эффективности направленного редактирования РНК. Чтобы протестировать наиболее эффективную архитектуру агРНК, кольцевые агРНК были фланкированы линкером из 25 или 50 нуклеотидов, соединенным с последовательностью лигирования на обоих концах (ФИГ. 4А). Для сравнения одновременно также трансфицировали линейную (некольцевую) агРНК<sub>71</sub> и агРНК<sub>111</sub>. Оказалось, что кольцевые агРНК существенно улучшали как соотношения EGFP<sup>+</sup> клеток, так и интенсивность EGFP (ФИГ. 4С) по сравнению с линейными агРНК, в то время как кольцевые агРНК с линкером из 25 или 50 нуклеотидов ослабляли улучшение эффективности (ФИГ. 4С).

[275] В НЕК293Т, стабильно экспрессирующих Репортер-3 (ФИГ. 4В), дополнительно тестировали влияние длины на эффективность редактирования. Исходя из соотношений репортера EGFP, длина кольцевой агРНК положительно коррелировала с эффективностью редактирования, достигая пика при длине от 111 до 151 нуклеотидов



| Название                                  | Последовательность (5' ---> 3')                                                                                                                                                      |
|-------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                                           | CUGCCUCCUCCGCCGCGUGCCUCCCAACACACAAAACCACCACACCA<br>ACCCCAACAACCACACACCCACACAAC (SEQ ID NO: 32)                                                                                       |
| Кольцевая контр<br>PHK <sub>123</sub>     | UUGCCAUGUGUAUGUGGGGAGACGGUCGGGUCCAGAUAUUCGUAU<br>CUGUCGAGUAGAGUGUGGGGCUCCCCACAUACUCUGAUGAUCCAGA<br>GACGAUAUUACGUCUCAGGAUCAUUAUGGCAA (SEQ ID NO: 33)                                  |
| arPHK <sub>71</sub>                       | ACAGCUCCUCGCCCCUUGCUCACUGGCAGAGCCCUCCAGCAUCGCGA<br>GCAGGCGCUGCCUCCUCCGCCGCGUG (SEQ ID NO: 34)                                                                                        |
| Контр arPHK <sub>71</sub>                 | UUUCAGCUAUACCUGCCCCGGUAUAAAGGGACGUUCACACCGCGAU<br>GUUCUCUGCUGGGGAAUUGCGCGAUA (SEQ ID NO: 35)                                                                                         |
| arPHK <sub>111</sub>                      | GAUGGGCACCACCCCGGUGAACAGCUCCUCGCCCCUUGCUCACUGGC<br>AGAGCCCUCCAGCAUCGCGAGCAGGCGCUGCCUCCUCCGCCGCGUGC<br>CUCCUCCGCCGCGUGCCUCC (SEQ ID NO: 36)                                           |
| Контр arPHK <sub>111</sub>                | UACCGCUACAGCCACGCUGAUUUCAGCUAUACCUGCCCCGGUAUAA<br>AGGGACGUUCACACCGCGAUGUUCUCUGCUGGGGAAUUGCGCGAU<br>AUUCAGGAUUAAGAAGUGC (SEQ ID NO: 37)                                               |
| Контр arPHK <sub>151</sub><br>(кольцевая) | ACUACAGUUGCUCGGAUUAUUAGGCUACGUCAAUAGGCACUAACU<br>UAUUGGCGCUGGUGAACGGACUCCUCUCGAGUACCAGAAGAUGA<br>CUACAAAACUCCUUAUUGCGAGUAUCGGAGUCUGGCUCAGUU<br>UGGCCAGGGAGGCACU (SEQ ID NO: 38)      |
| 31-нт                                     | ACUGGCAGAGCCCUCCAGCAUCGCGAGCAGG (SEQ ID NO: 39)                                                                                                                                      |
| 51-нт                                     | GCCCUUGCUCACUGGCAGAGCCCUCCAGCAUCGCGAGCAGGCGCUG<br>CCUCC (SEQ ID NO: 40)                                                                                                              |
| 71-нт                                     | ACAGCUCCUCGCCCCUUGCUCACUGGCAGAGCCCUCCAGCAUCGCGA<br>GCAGGCGCUGCCUCCUCCGCCGUGC (SEQ ID NO: 41)                                                                                         |
| 91-нт                                     | ACCCCGGUGAACAGCUCCUCGCCCCUUGCUCACUGGCAGAGCCCUCC<br>AGCAUCGCGAGCAGGCGCUGCCUCCUCCGCCGUGCAGCUUGUACA<br>(SEQ ID NO: 42)                                                                  |
| 111-нт                                    | GAUGGGCACCACCCCGGUGAACAGCUCCUCGCCCCUUGCUCACUGGC<br>AGAGCCCUCCAGCAUCGCGAGCAGGCGCUGCCUCCUCCGCCGUGCA<br>GCUUGUACAGCUCGUCCA (SEQ ID NO: 43)                                              |
| 131-нт                                    | GCUCGACCAGGAUGGGCACCACCCCGGUGAACAGCUCCUCGCCCCU<br>GCUCACUGGCAGAGCCCUCCAGCAUCGCGAGCAGGCGCUGCCUCCU<br>CCGCCGUGCAGCUUGUACAGCUCGUCCAUGCCGCCGGUG (SEQ ID<br>NO: 44)                       |
| 151-нт                                    | UCGCCGUCCAGCUCGACCAGGAUGGGCACCACCCCGGUGAACAGCU<br>CCUCGCCCCUUGCUCACUGGCAGAGCCCUCCAGCAUCGCGAGCAGGC<br>GCUGCCUCCUCCGCCGUGCAGCUUGUACAGCUCGUCCAUGCCGCCG<br>GUGGAGUGGCGGC (SEQ ID NO: 45) |
| arPHK <sub>111</sub>                      | GAUGGGCACCACCCCGGUGAACAGCUCCUCGCCCCUUGCUCACUGGC<br>AGAGCCCUCCAGCAUCGCGAGCAGGCGCUGCCUCCUCCGCCGCGUGC<br>CUCCUCCGCCGCGUGCCUCC (SEQ ID NO: 46)                                           |
| Контр arPHK <sub>111</sub>                | UACCGCUACAGCCACGCUGAUUUCAGCUAUACCUGCCCCGGUAUAA<br>AGGGACGUUCACACCGCGAUGUUCUCUGCUGGGGAAUUGCGCGAU<br>AUUCAGGAUUAAGAAGUGC (SEQ ID NO: 47)                                               |
| Кольцевая<br>arPHK <sub>111</sub>         | GAUGGGCACCACCCCGGUGAACAGCUCCUCGCCCCUUGCUCACUGGC<br>AGAGCCCUCCAGCAUCGCGAGCAGGCGCUGCCUCCUCCGCCGCGUGC                                                                                   |

| Название                                | Последовательность (5' ---> 3')                                                                                                          |
|-----------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                                         | CUCCUCCGCCGCUGCCUCC (SEQ ID NO: 48)                                                                                                      |
| Кольцевая контр<br>arPHK <sub>111</sub> | UACCGCUACAGCCACGCUGAUUUCAGCUAUACCUGCCCCGGUAUAA<br>AGGGACGUUCACACCGCGAUGUUCUCUGCUGGGGAAUUGCGCGAU<br>AUUCAGGAUUAAAAGAAGUGC (SEQ ID NO: 49) |

#### **Пример 4. Коррекция преждевременного стоп-кодона с помощью системы LEAPER с кольцевыми arPHK**

[278] Многие заболевания вызваны преждевременным стоп-кодоном (PTC). Чтобы изучить потенциал LEAPER с кольцевой arPHK в лечении заболеваний, связанных с PTC, был сконструирован репортер с внутрирамочным стоп-кодоном UAA. Было разработано три версии кольцевых arPHK (т. е. Tornado-arPHK<sub>111-A1</sub>, Tornado-arPHK<sub>111-A2</sub> и Tornado-arPHK<sub>111-2A</sub>) для нацеливания на сайт UAA этого репортера и проведено сравнение процента положительности на EGFP для трех разных arPHK. Оказалось, что Tornado-arPHK<sub>111-A2</sub>, нацеленная на второй аденозин кодона TAA, является более эффективной (ФИГ. 5).

#### **Пример 5. Модуляция сплайсинга мРНК с помощью системы LEAPER с кольцевыми arPHK**

[279] Внесение изменений в сплайсинг мРНК для создания новых продуктов сплайсинга является стратегией лечения таких заболеваний, как мышечная дистрофия Дюшенна. Репортер сплайсинга RG6 использовали для проверки того, может ли LEAPER с кольцевыми arPHK изменять акцепторный сайт сплайсинга. Были разработаны три версии кольцевых arPHK для нацеливания на акцепторный сайт сплайсинга RG6, включая Tornado-arPHK<sub>71</sub> (71-нт), Tornado-arPHK<sub>71</sub>(111-нт) и Tornado-arPHK<sub>71+BP</sub> (111-нт, нацеленная как на акцепторный сайт, так и на точку ветвления). В клетке HEK293T репортер RG6 экспрессировал больше белка дцPHK, чем белка EGFP, в случае изменения профиля сплайсинга посредством LEAPER-Tornado (ФИГ. 6A). Авторы обнаружили, что LEAPER с кольцевыми arPHK может эффективно нацеливаться на механизм клеточного сплайсинга (ФИГ. 6B).

#### **Пример 6. Лентивирусная доставка системы LEAPER с кольцевыми arPHK**

[280] Непрерывное дозирование терапевтической РНК важно для ее эффективности. Было проверено, может ли лентивирусная доставка LEAPER с кольцевыми агРНК обеспечить редактирование РНК. Было обнаружено, что LEAPER с кольцевыми агРНК мог функционировать при использовании лентивирусной доставки, посредством которой различные Tornado-агРНК могли встраиваться в геном и стабильно экспрессироваться. Длина Tornado-агРНК положительно коррелировала с эффективностью редактирования (ФИГ. 7).

#### ЦИТИРУЕМЫЕ ИСТОЧНИКИ

- 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).

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ редактирования целевой РНК в клетке-хозяине, включающий введение рекрутирующей дезаминазы РНК (dРНК) или конструкции, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую dРНК, в клетку-хозяина, где:

(1) dРНК содержит нацеливающую последовательность РНК, по меньшей мере частично комплементарную целевой РНК,

(2) dРНК способна рекрутировать РНК-специфическую аденозиндезаминазу (ADAR), и

(3) dРНК представляет собой кольцевую РНК или способна образовывать кольцевую РНК.

2. Способ по п. 1, где dРНК дополнительно содержит 3'-последовательность лигирования и 5'-последовательность лигирования, необязательно где:

(i) 3'-последовательность лигирования и 5'-последовательность лигирования по меньшей мере частично комплементарны друг другу; и/или

(ii) 3'-последовательность лигирования и 5'-последовательность лигирования имеют длину от приблизительно 20 до приблизительно 75 нуклеотидов.

3. dРНК по п. 1 или п. 2, где dРНК представляет собой кольцевую РНК.

4. dРНК по п. 1 или п. 2, где dРНК представляет собой линейную РНК, способную образовывать кольцевую РНК.

5. Способ по п. 4, где dРНК циклизуют с помощью РНК-лигазы RtcB, необязательно где РНК-лигаза RtcB эндогенно экспрессируется в клетке-хозяине.

6. Способ по любому из пп. 1-5, включающий введение конструкции, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую dРНК, в клетку-хозяина.

7. Способ по п. 6, где конструкция дополнительно содержит 3'-последовательность рибозима twister, связанную с 3'-концом нуклеиновой кислоты, кодирующей dРНК, и 5'-последовательность рибозима twister, связанную с 5'-концом нуклеиновой кислоты, кодирующей dРНК, необязательно где:

(i) 3'-последовательность twister представляет собой twister P3 U2A, и 5'-последовательность twister представляет собой twister P1; или

(ii) 5'-последовательность twister представляет собой twister P3 U2A, и 3'-последовательность twister представляет собой twister P1.

8. Способ редактирования целевой РНК в клетке-хозяине, включающий введение рекрутирующей дезаминазы РНК (dРНК) или конструкции, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую dРНК, в клетку-хозяина, где dРНК содержит:

(1) нацеливающую последовательность РНК, по меньшей мере частично комплементарную целевой РНК, и

(2) последовательность малой ядрышковой РНК (мякРНК), связанную с 3'- и/или 5'-концами нацеливающей последовательности РНК;

и где dРНК способна рекрутировать РНК-специфическую аденозиндезаминазу (ADAR).

9. Способ по п. 8, где:

(i) dРНК содержит последовательность мякРНК, связанную с 5'-концом нацеливающей последовательности РНК («5'-последовательность мякРНК»);

(ii) dРНК содержит последовательность мякРНК, связанную с 3'-концом нацеливающей последовательности РНК («3'-последовательность мякРНК»);

(iii) последовательность мякРНК имеет длину по меньшей мере приблизительно 70 нуклеотидов;

(iv) 3'-последовательность мякРНК содержит последовательность нуклеиновой кислоты согласно SEQ ID NO: 1;

(v) 5'-последовательность мякРНК содержит последовательность нуклеиновой кислоты согласно SEQ ID NO: 2; и/или

(vi) последовательность мякРНК представляет собой последовательность C/D-бокс-мякРНК, последовательность H/ACA-бокс-мякРНК, последовательность составной C/D-бокс- и H/ACA-бокс-мякРНК или последовательность «сиротской» мякРНК.

10. Способ по п. 8 или п. 9, включающий введение конструкции, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую dРНК, в клетку-хозяина.

11. Способ по пп. 6-7 или 10, где конструкция дополнительно содержит промотор, функционально связанный с нуклеиновой кислотой, кодирующей dРНК, где промотор представляет собой промотор полимеразы II («промотор Pol II»).

12. Способ редактирования целевой РНК в клетке-хозяине, включающий введение конструкции, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую рекрутирующую дезаминазу РНК (dРНК), в клетку-хозяина, где:

(1) dРНК содержит нацеливающую последовательность РНК, по меньшей мере частично комплементарную целевой РНК,

(2) dРНК способна рекрутировать РНК-специфическую аденозиндезаминазу (ADAR), и

(3) конструкция содержит промотор полимеразы II («промотор Pol II»), функционально связанный с нуклеиновой кислотой, кодирующей dPHK.

13. Способ по п. 11 или п. 12, где промотор Pol II представляет собой промотор CMV (цитомегаловируса), необязательно где промотор CMV содержит последовательность нуклеиновой кислоты согласно SEQ ID NO: 3.

14. Способ по любому из пп. 6-7 и 10-13, где конструкция представляет собой вирусный вектор или плазмиду, необязательно где конструкция представляет собой вектор AAV (аденоассоциированного вируса).

15. Способ по любому из пп. 1-14, где ADAR эндогенно экспрессируется клеткой-хозяином, необязательно где клетка-хозяин представляет собой Т-клетку.

16. Способ по любому из пп. 1-15, где:

(i) нацеливающая последовательность РНК имеет длину более чем 50 нуклеотидов, необязательно где нацеливающая последовательность РНК имеет длину от приблизительно 100 до приблизительно 150 нуклеотидов;

(ii) нацеливающая последовательность РНК содержит цитидин, аденозин или уридин прямо напротив целевого аденозина в целевой РНК, необязательно где нацеливающая последовательность РНК содержит нарушающий комплементарность цитидин прямо напротив целевого аденозина в целевой РНК, например, где нарушающий комплементарность цитидин расположен по меньшей мере через 20 нуклеотидов от 3'-конца нацеливающей последовательности РНК и по меньшей мере через 5 нуклеотидов от 5'-конца нацеливающей последовательности РНК;

(iii) нацеливающая последовательность РНК дополнительно содержит один или более гуанозинов, каждый из которых расположен напротив нецелевого аденозина в целевой РНК;

(iv) нацеливающая последовательность РНК содержит два или более последовательных нарушающих комплементарность нуклеотидов напротив нецелевого аденозина в целевой РНК;

(v) ближайший сосед целевого аденозина с 5'-конца в целевой РНК представляет собой нуклеотид, выбранный из U, C, A и G с предпочтением  $U > C \approx A > G$ , и ближайший сосед целевого аденозина с 3'-конца в целевой РНК представляет собой нуклеотид, выбранный из G, C, A и U с предпочтением  $G > C > A \approx U$ ;

(vi) 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, необязательно где мотив из трех оснований представляет собой UAG, и где нацеливающая РНК содержит А, расположенный прямо напротив уридина в мотиве из трех оснований, цитидин, расположенный прямо напротив целевого аденозина, и цитидин, гуанозин или уридин, расположенный прямо напротив гуанозина в мотиве из трех оснований; и/или

(vii) целевая РНК представляет собой РНК, выбранную из группы, состоящей из прематричной РНК, матричной РНК, рибосомной РНК, транспортной РНК, длинной некодирующей РНК и малой РНК, необязательно где целевая РНК представляет собой прематричную РНК.

17. Способ по любому из пп. 1-16, дополнительно включающий введение ингибитора ADAR3 и/или стимулятора интерферона в клетку-хозяина.

18. Способ по любому из пп. 1-17, включающий введение множества dРНК или конструкций, каждая из которых нацелена на отличающуюся целевую РНК.

19. Способ по любому из пп. 1-18, где эффективность редактирования целевой РНК составляет по меньшей мере 40%.

20. Способ по любому из пп. 1-19, где конструкция или dРНК не вызывает иммунный ответ.

21. Способ по любому из пп. 1-20, дополнительно включающий введение ADAR в клетку-хозяина, необязательно где ADAR представляет собой ADAR1, содержащую мутацию E1008.

22. Способ по любому из пп. 1-21, где дезаминирование целевого аденозина в целевой РНК приводит к миссенс-мутации, раннему стоп-кодону, абберрантному сплайсингу или альтернативному сплайсингу в целевой РНК, или реверсии миссенс-мутации, раннего стоп-кодона, абберрантного сплайсинга или альтернативного сплайсинга в целевой РНК, необязательно где дезаминирование целевого аденозина в целевой РНК приводит к точечной мутации, усечению, удлинению и/или неправильной укладке белка, кодируемого целевой РНК, или к образованию функционального, полноразмерного, правильно уложенного белка и/или белка дикого типа посредством реверсии миссенс-мутации, раннего стоп-кодона, абберрантного сплайсинга или альтернативного сплайсинга в целевой РНК.

23. Способ по любому из пп. 1-22, где клетка-хозяин представляет собой эукариотическую клетку, необязательно где клетка-хозяин представляет собой клетку

млекопитающего, например, где клетка-хозяин представляет собой человеческую или мышиную клетку.

24. Отредактированная РНК или клетка-хозяин, имеющая отредактированную РНК, полученные способом по любому из пп. 1-23.

25. Способ лечения или предупреждения заболевания или состояния у индивидуума, включающий редактирование целевой РНК, связанной с указанным заболеванием или состоянием, в клетке индивидуума в соответствии со способом по любому из пп. 1-23.

26. Способ по п. 25, где:

- (i) заболевание или состояние представляет собой наследственное генетическое заболевание, или заболевание или состояние, связанное с одной или более приобретенными генетическими мутациями;
- (ii) целевая РНК имеет мутацию G в A; и/или
- (iii) заболевание или состояние представляет собой моногенное или полигенное заболевание или состояние.

27. Способ по п. 25 или п. 26, 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 (МПС 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 Жубер;
- (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 семейную гипертрофическую кардиомиопатию; или
- (vii) целевая РНК представляет собой *IL2RG*, и заболевание или состояние представляет собой X-сцепленный тяжелый комбинированный иммунодефицит.

28. Рекрутирующая дезаминаза РНК (dРНК) для редактирования целевой РНК, содержащая нацеливающую последовательность РНК, по меньшей мере частично комплементарную целевой РНК, где dРНК способна рекрутировать РНК-специфическую

аденозиндезаминазу (ADAR), и где dPHK является кольцевой или способна образовывать кольцевую РНК.

29. dPHK по п. 28, где dPHK дополнительно содержит 3'-последовательность лигирования и 5'-последовательность лигирования, необязательно где:

- (i) 3'-последовательность лигирования и 5'-последовательность лигирования по меньшей мере частично комплементарны друг другу; и/или
- (ii) 3'-последовательность лигирования и 5'-последовательность лигирования имеют длину от приблизительно 20 до приблизительно 75 нуклеотидов.

30. dPHK по п. 28 или п. 29, где dPHK представляет собой кольцевую РНК.

31. dPHK по п. 28 или п. 29, где dPHK представляет собой линейную РНК, способную образовывать кольцевую РНК.

32. Конструкция, содержащая нуклеиновую кислоту, кодирующую dPHK по любому из пп. 28-31.

33. Конструкция по п. 32, дополнительно содержащая 3'-последовательность рибозима twister, связанную с 3'-концом нуклеиновой кислоты, кодирующей dPHK, и 5'-последовательность рибозима twister, связанную с 5'-концом нуклеиновой кислоты, кодирующей dPHK, необязательно где:

- (i) 3'-последовательность twister представляет собой twister P3 U2A, и 5'-последовательность twister представляет собой twister P1; или
- (ii) 5'-последовательность twister представляет собой twister P3 U2A, и 3'-последовательность twister представляет собой twister P1.

34. Рекрутирующая дезаминазу РНК (dPHK) для редактирования целевой РНК, содержащая:

(1) нацеливающую последовательность РНК, по меньшей мере частично комплементарную целевой РНК, и

(2) последовательность малой ядрышковой РНК (мякРНК) на 3'- и/или 5'-концах нацеливающей последовательности РНК;

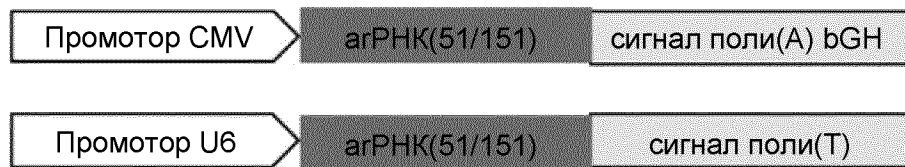
где dPHK способна рекрутировать РНК-специфическую аденозиндезаминазу (ADAR).

35. dPHK по п. 34, где:

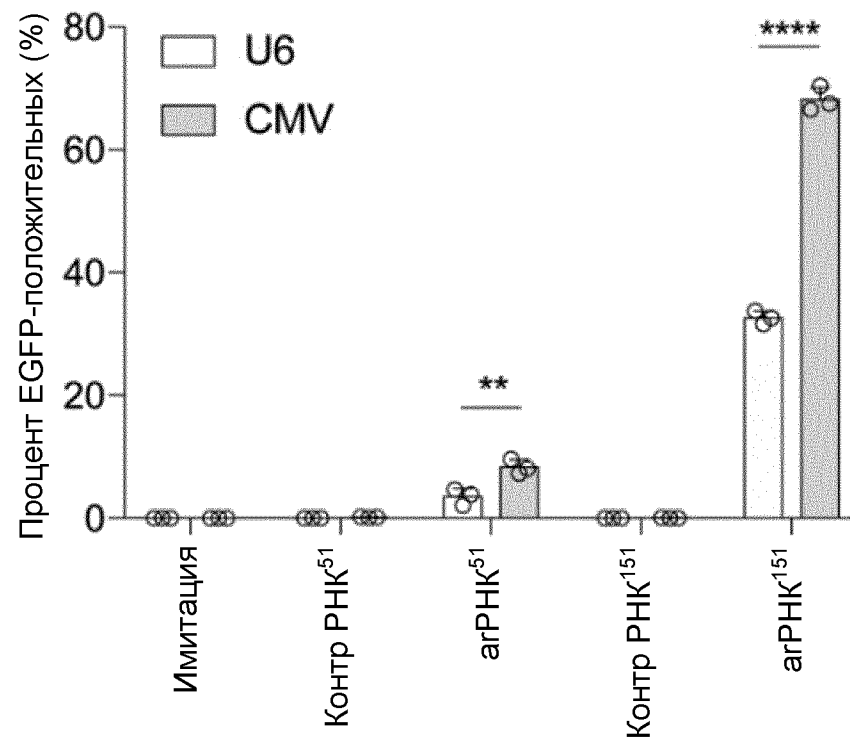
- (i) dPHK содержит последовательность мякРНК, связанную с 5'-концом нацеливающей последовательности РНК («5'-последовательность мякРНК»);
- (ii) dPHK содержит последовательность мякРНК, связанную с 3'-концом нацеливающей последовательности РНК («3'-последовательность мякРНК»);

- (iii) последовательность мЯКРНК имеет длину по меньшей мере приблизительно 70 нуклеотидов;
  - (iv) 3'-последовательность мЯКРНК содержит последовательность нуклеиновой кислоты согласно SEQ ID NO: 1;
  - (v) 5'-последовательность мЯКРНК содержит последовательность нуклеиновой кислоты согласно SEQ ID NO: 2; и/или
  - (vi) последовательность мЯКРНК представляет собой последовательность C/D-бокс-мЯКРНК, последовательность H/ACA-бокс-мЯКРНК, последовательность составной C/D-бокс- и H/ACA-бокс-мЯКРНК или последовательность «сиротской» мЯКРНК.
36. Конструкция, содержащая нуклеиновую кислоту, кодирующую dРНК по п. 34 или п. 35.
37. Конструкция по любому из пп. 32-33 и 36, дополнительно содержащая промотор, функционально связанный с нуклеиновой кислотой, кодирующей dРНК, где промотор представляет собой промотор полимеразы II («промотор Pol II»).
38. Конструкция, содержащая нуклеиновую кислоту, кодирующую рекрутирующую дезаминазу РНК (dРНК) в клетке-хозяине, где:
- (1) dРНК содержит нацеливающую последовательность РНК, по меньшей мере частично комплементарную целевой РНК,
  - (2) dРНК способна рекрутировать РНК-специфическую аденозиндезаминазу (ADAR), и
  - (3) конструкция содержит промотор полимеразы II («промотор Pol II»), функционально связанный с нуклеиновой кислотой, кодирующей dРНК.
39. Конструкция по п. 37 или п. 38, где промотор Pol II представляет собой промотор CMV, необязательно где промотор CMV содержит последовательность нуклеиновой кислоты согласно SEQ ID NO: 3.
40. Конструкция по любому из пп. 32-33 и 36-39, где конструкция представляет собой вирусный вектор или плазмиду, необязательно где конструкция представляет собой вектор AAV.
41. Конструкция или dРНК по любому из пп. 28-40, где целевая РНК представляет собой РНК, выбранную из группы, состоящей из прематричной РНК, матричной РНК, рибосомной РНК, транспортной РНК, длинной некодирующей РНК и малой РНК.
42. Клетка-хозяин, содержащая конструкцию или dРНК по любому из пп. 28-40.

43. Набор для редактирования целевой РНК в клетке-хозяине, содержащий конструкцию или dРНК по любому из пп. 28-40.



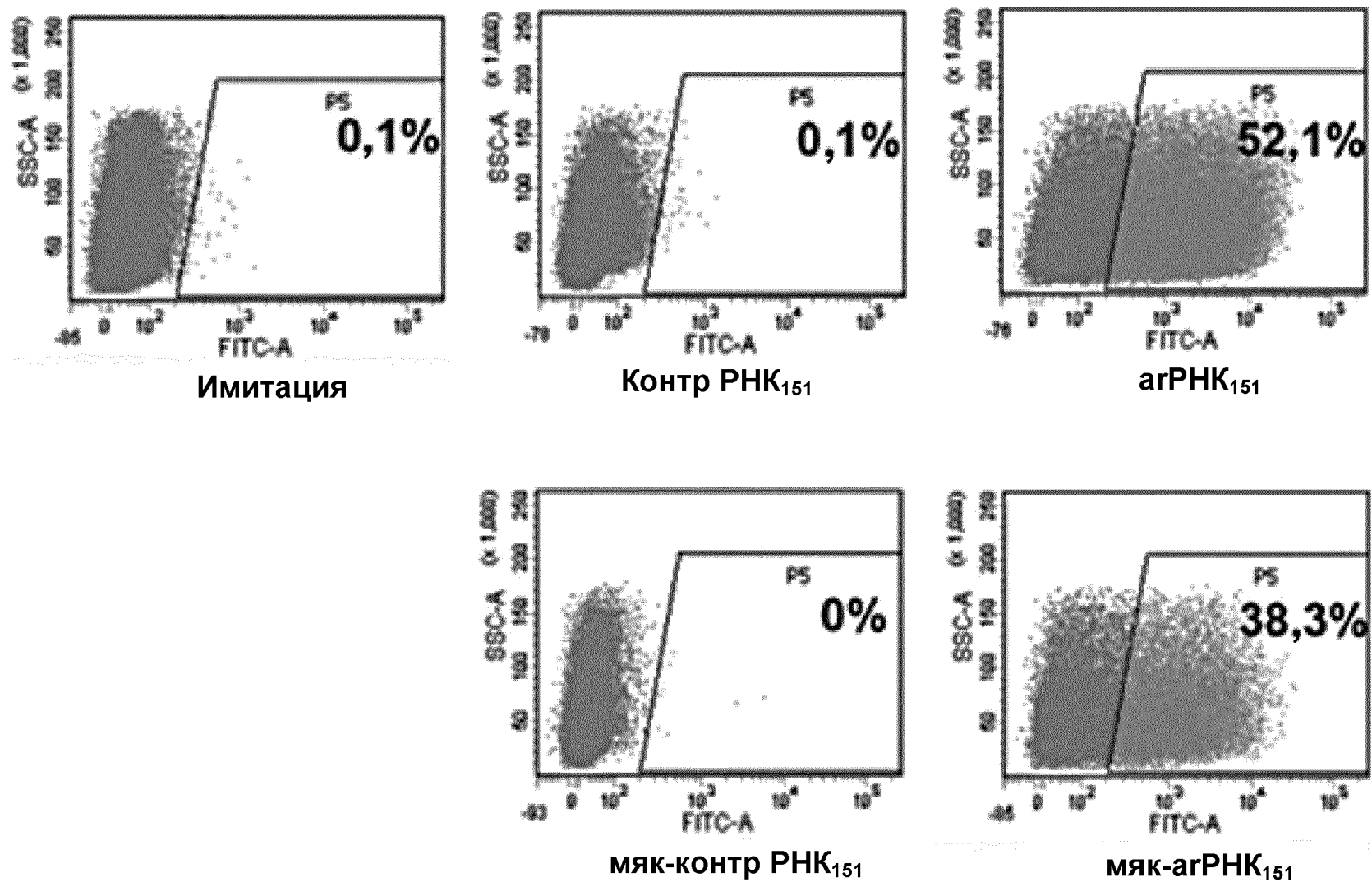
Сравнение U6 и CMV



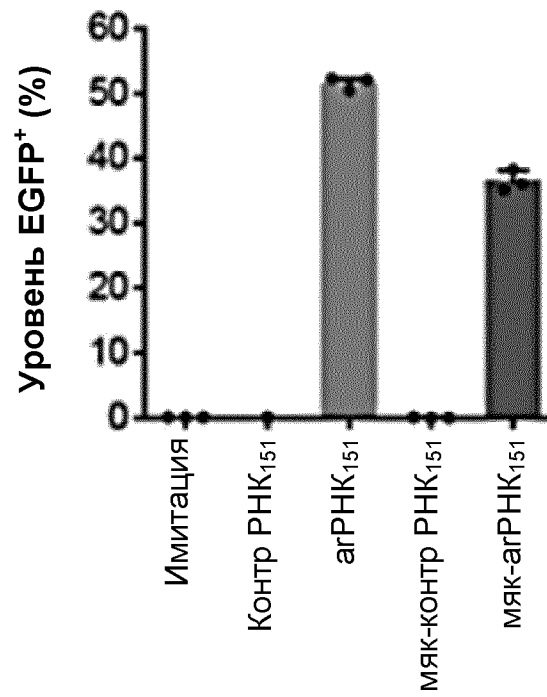
ФИГ. 1



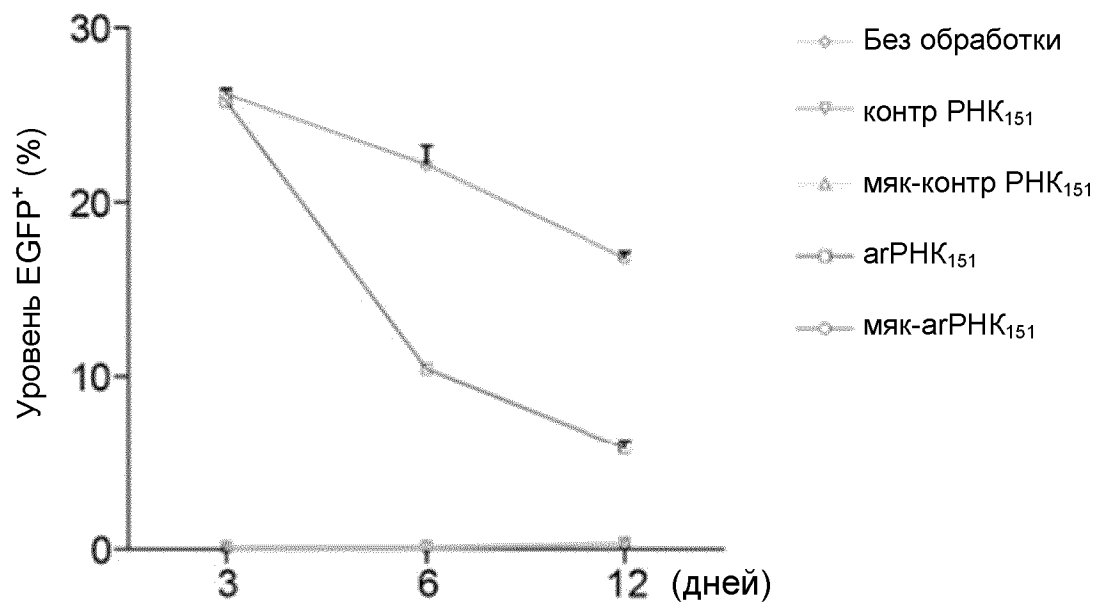
ФИГ. 2А



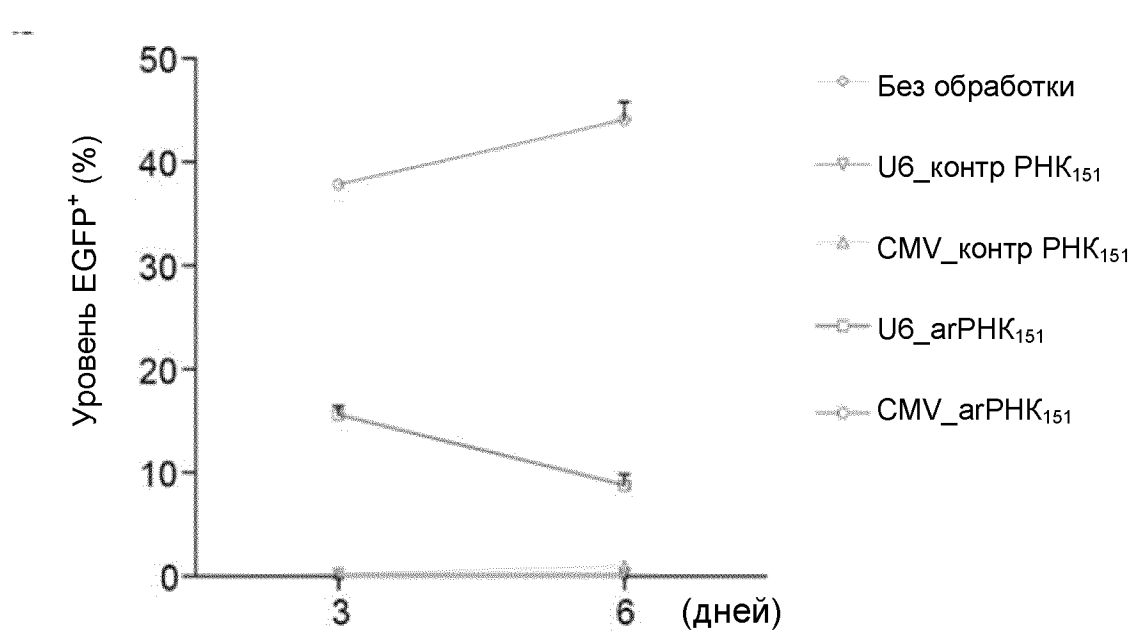
ФИГ. 2В



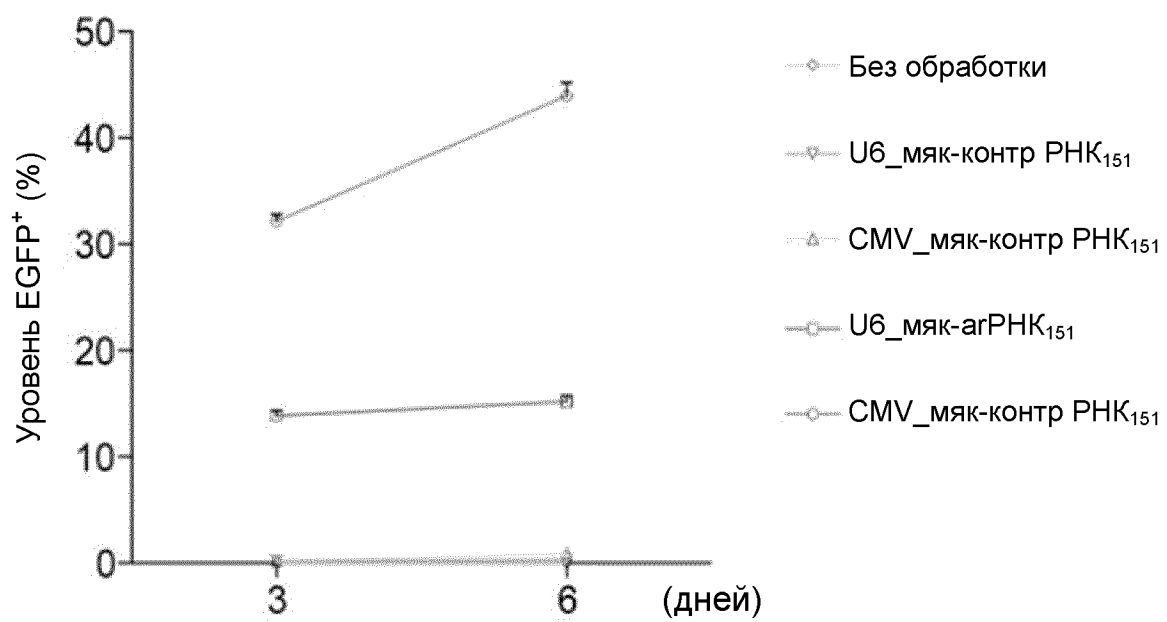
ФИГ. 2С



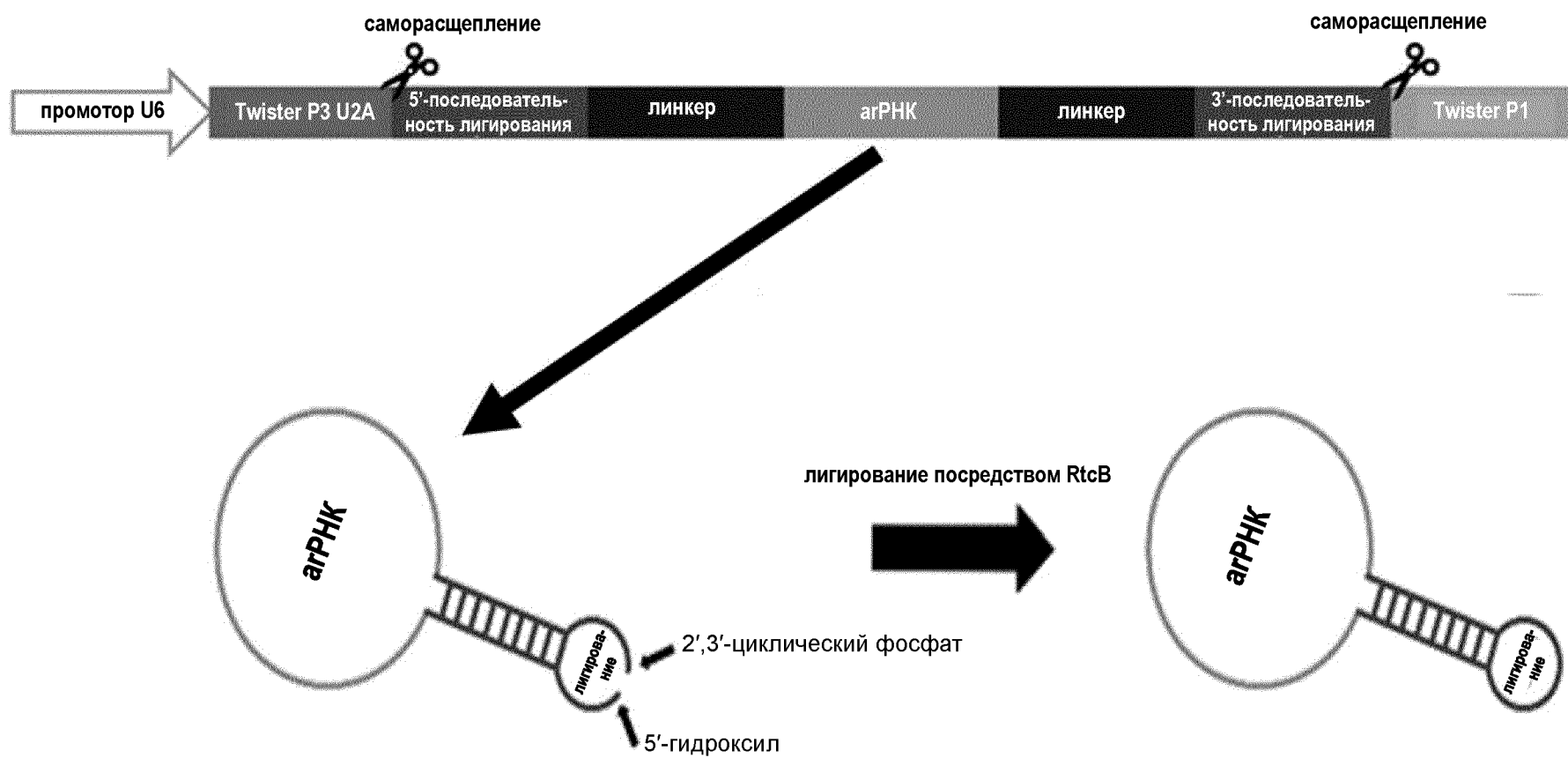
ФИГ. 3А



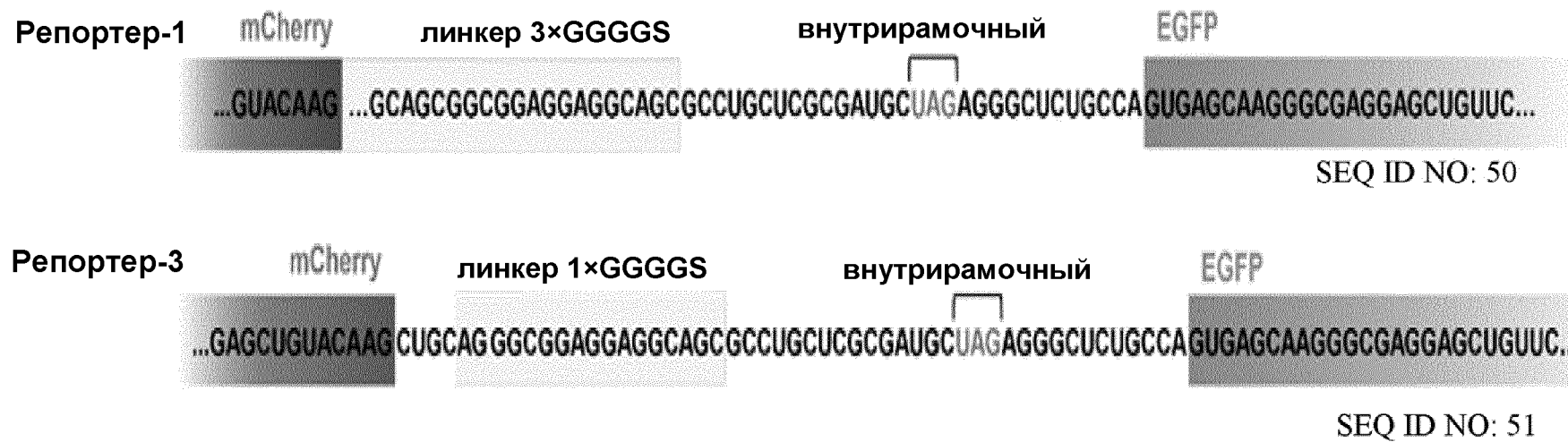
ФИГ. 3В



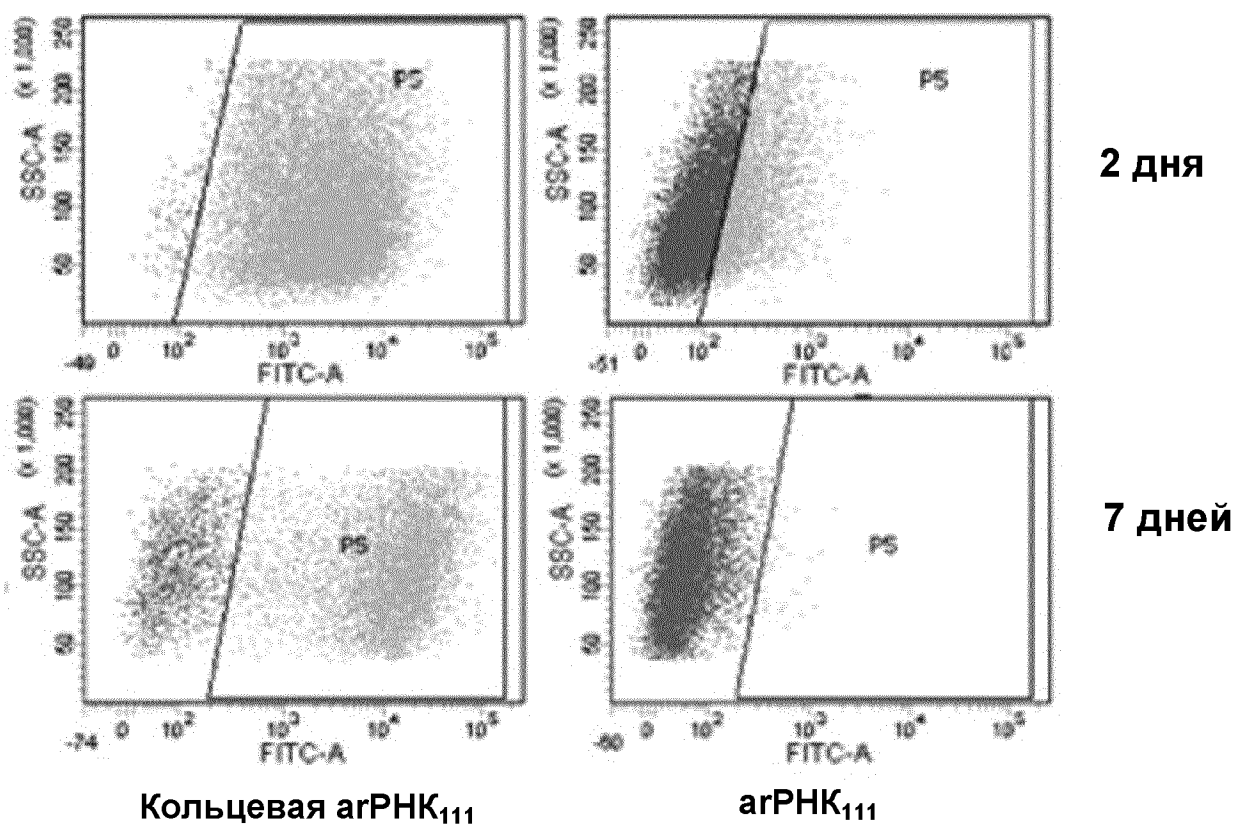
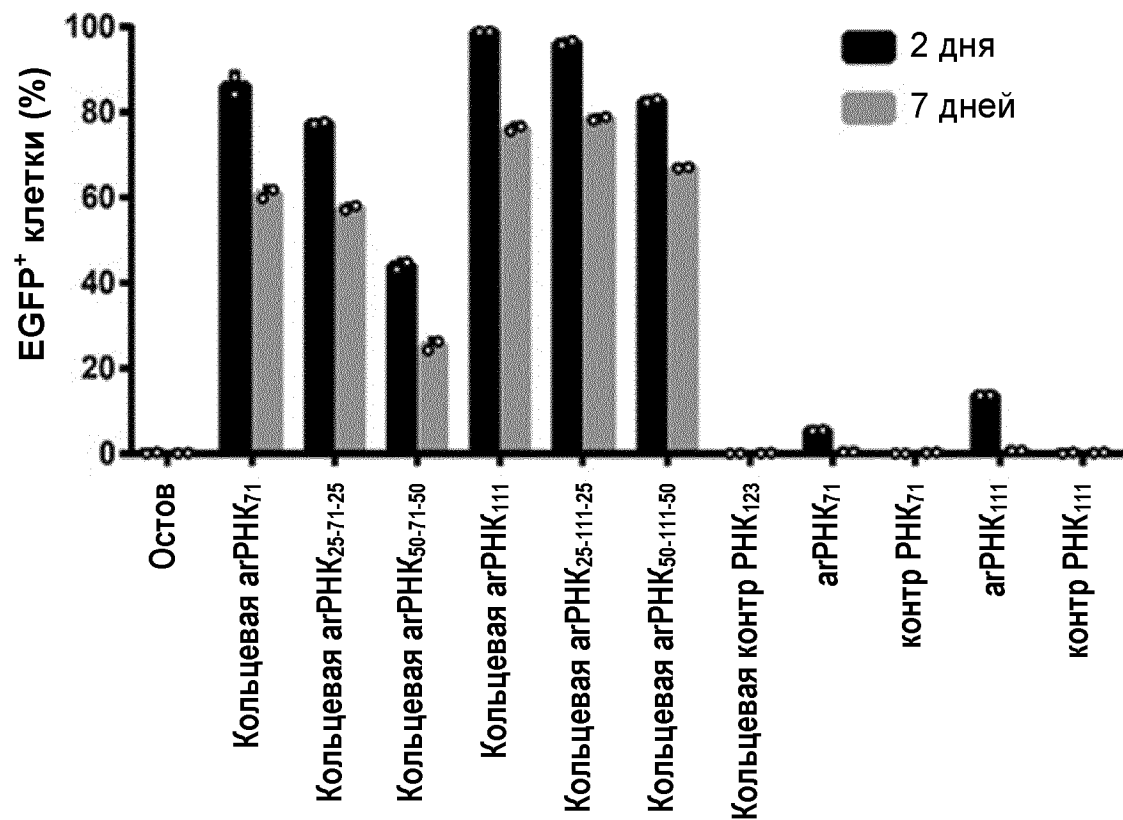
ФИГ. 3С



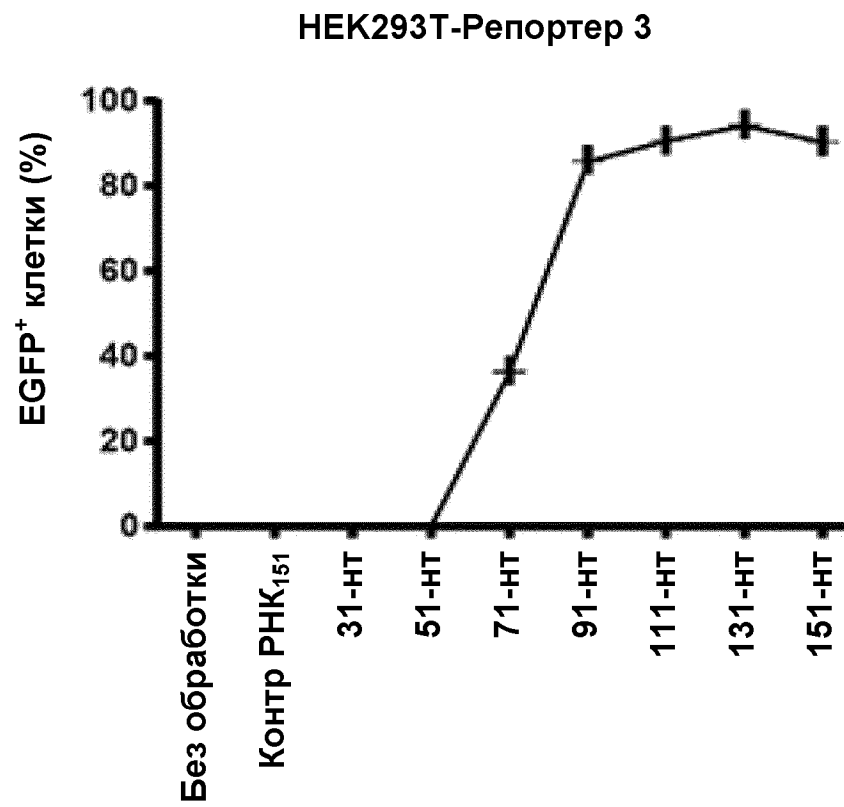
ФИГ. 4А



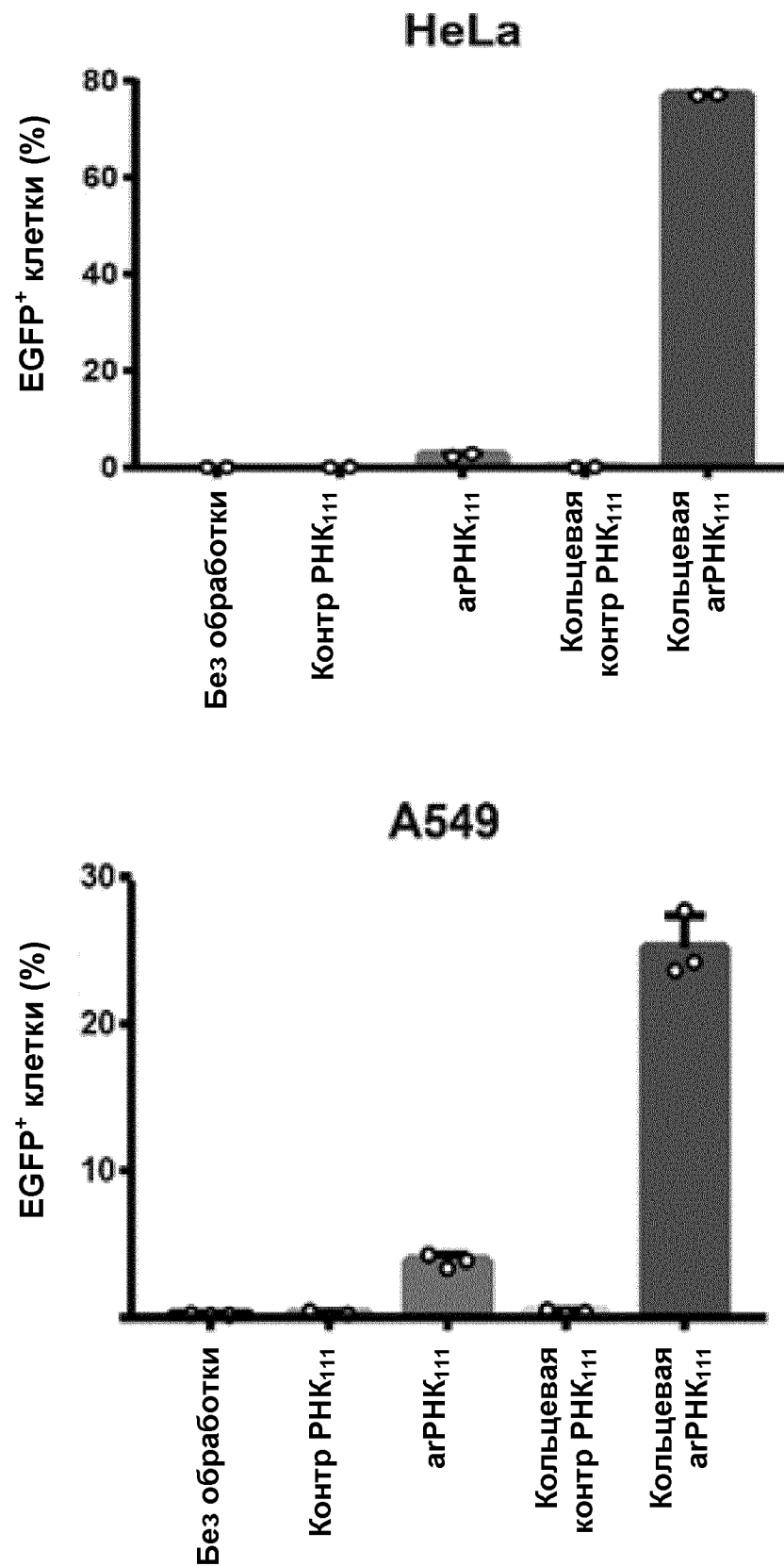
ФИГ. 4В



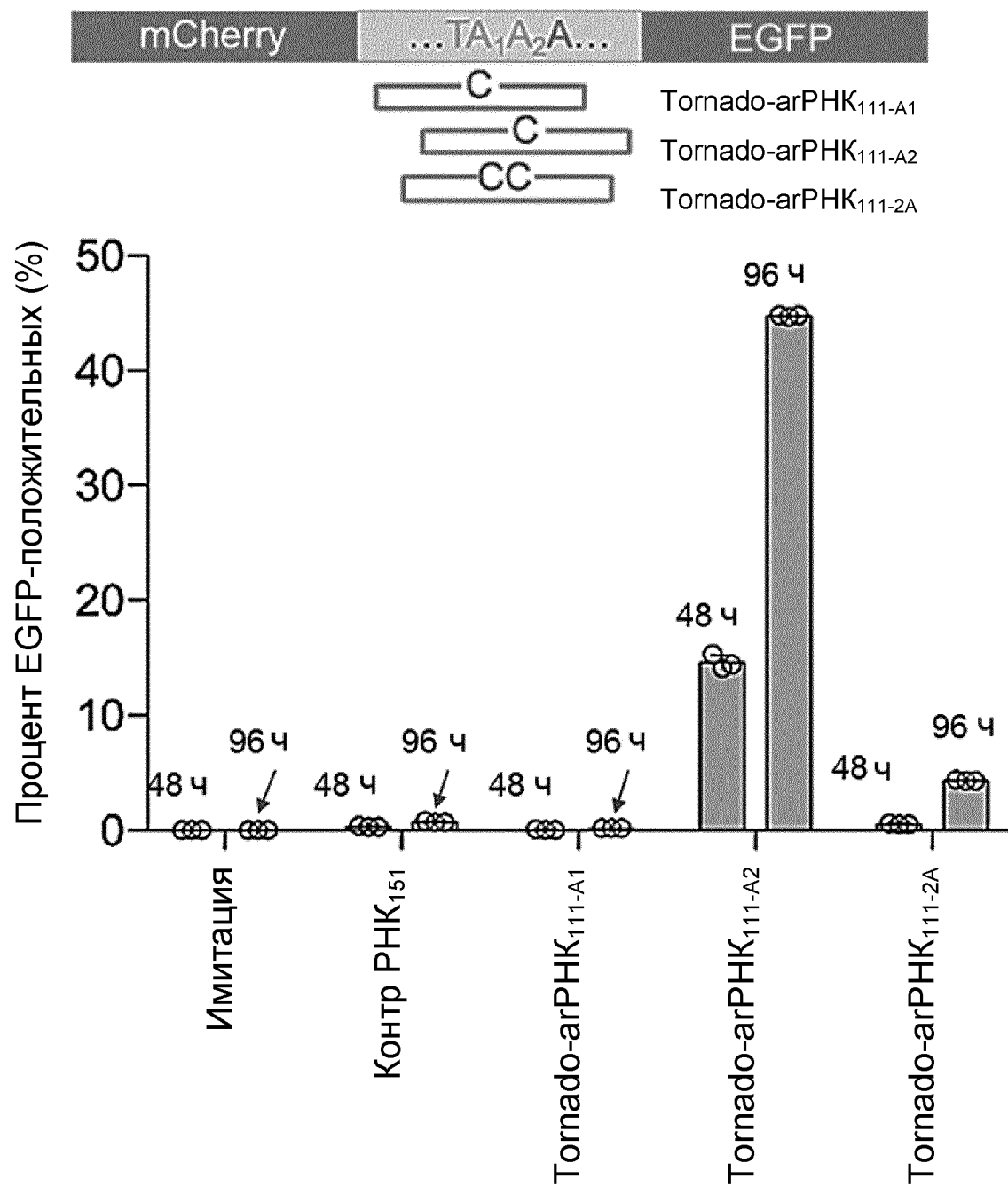
ФИГ. 4С



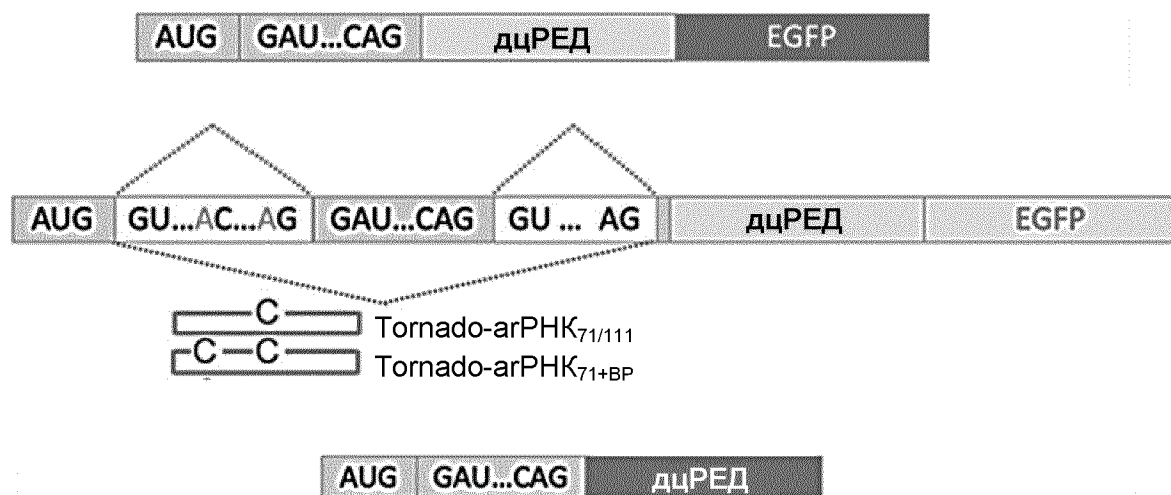
ФИГ. 4D



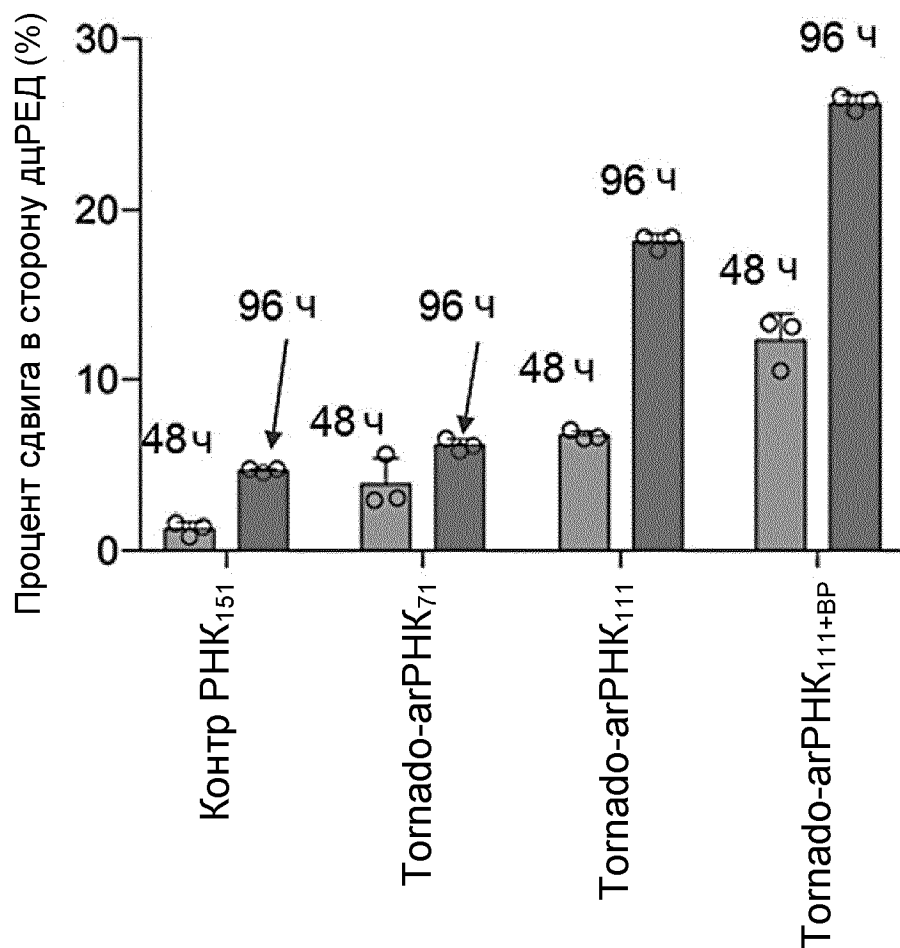
ФИГ. 4Е



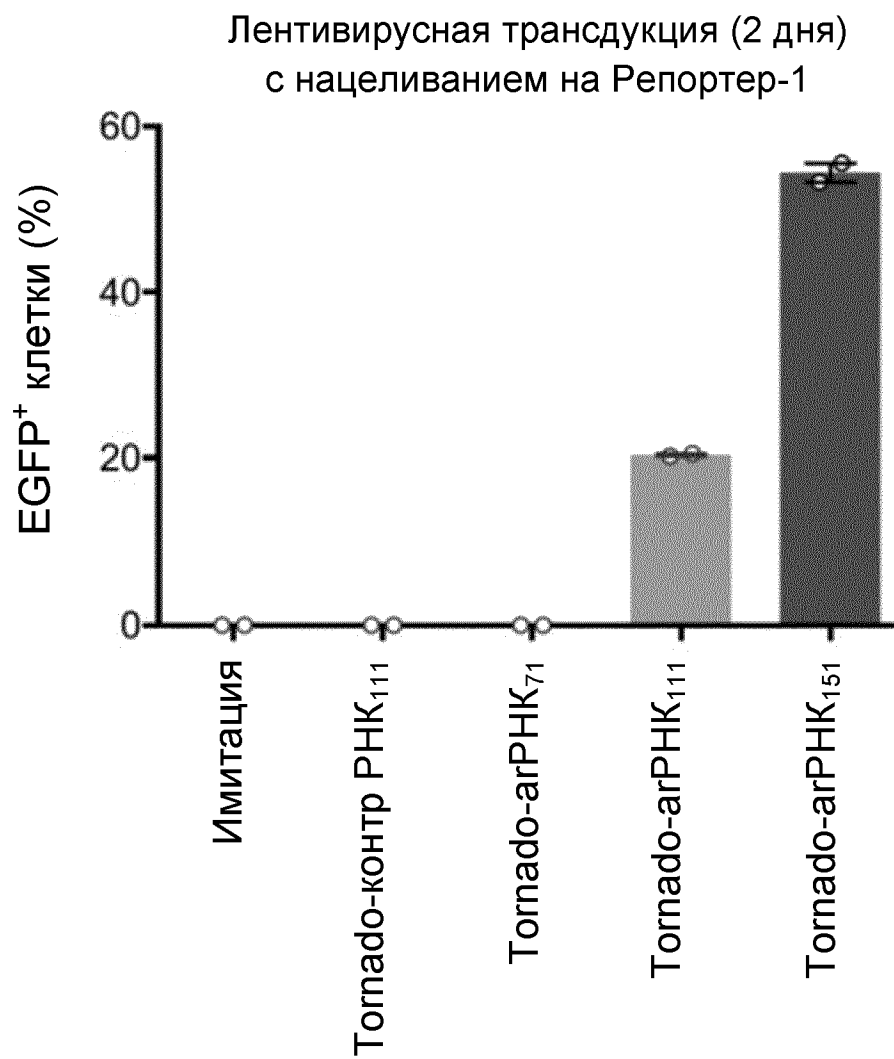
ФИГ. 5



ФИГ. 6А



ФИГ. 6В



ФИГ. 7