

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202291801** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.11.09

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

(22) Дата подачи заявки
2020.12.30

(54) МЕТОД НА ОСНОВЕ ТЕХНОЛОГИИ LEAPER ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ МПС ИИ И КОМПОЗИЦИЯ

(31) PCT/CN2019/129952

(32) 2019.12.30

(33) CN

(86) PCT/CN2020/141506

(87) WO 2021/136408 2021.07.08

(71) Заявитель:
**ЭДИДЖЕН ТЕРАПЬЮТИКС
(БЭЙЦЗИН) ИНК. (CN)**

(72) Изобретатель:

**Юань Пэнфэй, Чжао Янься, Лю
Нэнинь, И Цзэсюань, Тан Ганбинь
(CN)**

(74) Представитель:

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

(57) Изобретение относится к способу целевого редактирования РНК на основе LEAPER (Leveraging endogenous ADAR (Adenosine Deaminase Acting on RNA) for programmable editing of RNA - применение эндогенной ADAR (аденозиндезаминазы, действующей на РНК) для программируемого редактирования РНК), который включает безопасное и эффективное выполнение аденозин-в-инозин редактирования РНК (А-в-И редактирование РНК) с помощью LEAPER in vivo, благодаря чему сайты патогенных мутаций могут быть точно восстановлены, и все заболевания, вызванные мутациями G>A, такие как МПС ИИ (мукополисахаридоз I типа, синдром Гурлера), могут быть вылечены.

A1

202291801

202291801

A1

МЕТОД НА ОСНОВЕ ТЕХНОЛОГИИ LEAPER ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ МПС II И КОМПОЗИЦИЯ

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

Настоящая заявка относится к области терапевтических средств редактирования генов, и, в частности, относится к способу лечения МПС II (мукополисахаридоза I типа, синдром Гурлера) с помощью целевого редактирования РНК (рибонуклеиновая кислота) на основе LEAPER (Leveraging endogenous ADAR (Adenosine Deaminase Acting on RNA) for programmable editing of RNA - применение эндогенной ADAR (аденозиндеаминазы, действующей на РНК) для программируемого редактирования РНК), который включает: осуществление сайт-направленного редактирования РНК А-в-Г с помощью LEAPER in vivo для лечения заболеваний, вызванных мутациями G > A, таких как МПС II.

ПРЕДШЕСТВУЮЩИЙ УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Синдром Гурлера, также известный как мукополисахаридоз II (МПС II) или гликозаминогликановое расстройство II, является наиболее тяжелым из трех подтипов, т. е. II, II/S (тип I, синдром Гурлера-Шейе) и IS (тип I, синдром Шейе) из МПС I. Это инвалидизирующее и фатальное генетическое метаболическое заболевание, вызванное дефицитом α -L-идуронидазы (IDUA) у пациентов с этим заболеванием, и оно является аутосомно-рецессивным (AR) расстройством. Основным механизмом синдрома Гурлера являются мутации в гене IDUA для кодирования белка IDUA, расположенного на 4p16.3 хромосомы 4. До сих пор известно более 200 патогенных мутаций IDUA, и наиболее распространенным типом является мутация G-в-A в сайте 1205 кДНК (комплементарной ДНК). Благодаря этой мутации исходный триптофан превращается в концевой кодон, в результате чего в белке, полученном трансляцией, после этого сайта отсутствуют все аминокислоты (NM_000203.4(IDUA)-c.1205G-A(p.Trp402Ter)), и он теряет ферментативную активность IDUA. Этот тип мутации может вызывать 63 % общей заболеваемости (Worldwide distribution of common IDUA pathogenic variants, Poletto, Edina (2018). Clinical Genetics. 94. 10.1111/cge.13224.). α -L-идуронидаза отвечает за деградацию гликозаминогликанов (ГАГ) в лизосомах клеток. У пациентов с синдромом Гурлера симптомы различаются, и они могут отсутствовать при рождении. Самым ранним симптомом, который проявляется в возрасте 3-6 месяцев, является грубость черт лица, затем появляются другие симптомы, включая заметные лобные кости, аномалии скелета, остановку роста и ограниченные языковые способности, а смерть наступает обычно к 10 годам.

От синдрома Гурлера не существует лекарства. В настоящее время одобрены два способа лечения: ферментозаместительная терапия (ФЗТ) и трансплантация гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК). ФЗТ показала хороший эффект с точки зрения висцерального фенотипа, включая уменьшение размера печени, улучшение дыхательной функции и общее улучшение мобильности пациентов. С другой стороны, она не может достичь центральной нервной системы и, следовательно, не может предотвратить когнитивное нарушение. Успешная ТГСК может предотвратить большинство клинических симптомов, включая неврологические симптомы. Однако она должна применяться для лечения до появления клинических симптомов (предпочтительно в возрасте до 8 месяцев) и применима только для пациентов с тяжелыми заболеваниями из-за своей высокой смертности (Combination of enzyme replacement and hematopoietic stem cell transplantation as therapy for Hurler Syndrome. Tolar, J (2008). Bone marrow transplantation. 41. 531-5. 10.1038/sj.bmt.1705934).

В настоящее время принцип способа редактирования генов для лечения синдрома Гурлера заключается в применении нуклеазы с цинковыми пальцами (ZFN) и аденоассоциированного вируса (AAV) для встраивания последовательности кДНК для кодирования нормальных белков IDUA в геном гепатоцитов, но этот способ все еще не может устранить симптомы синдрома Гурлера со стороны головного мозга и скелетной системы, и нецелевое воздействие, вызванное редактированием ДНК, вызывает серьезную озабоченность.

Теоретически, CRISPR (Clustered regularly interspaced short palindromic repeats - короткие палиндромные повторы, регулярно расположенные группами), который быстро развивается в последние годы, также может применяться для лечения синдрома Гурлера. Многие исследователи и биотехнологические компании также стремятся применить этот способ на практике. Например, в сентябре 2019 года впервые были получены результаты клинических исследований по редактированию стволовых клеток с помощью CRISPR и их инфузии обратно пациентам для лечения СПИДа (синдрома приобретённого иммунного дефицита) и лейкоза, что внесло большой вклад в применение CRISPR в генной терапии. Хотя у CRISPR имеется большой потенциал применения, он также имеет ряд недостатков, которые затрудняют его применение от стадии исследования до клинического лечения. Одной из проблем является минимальный фермент, применяемый в CRISPR: Cas9. Редактирование ДНК на основе CRISPR основывается на экзогенно экспрессируемых Cas9 или других нуклеазах с аналогичными функциями, что вызывает несколько проблем. Во-первых, нуклеазы, подлежащие экзогенной экспрессии, обычно имеют большую молекулярную массу, что вызывает резкое снижение эффективности их доставки в организм

через вирусные векторы. Во-вторых, экзогенная экспрессия нуклеаз позволяет им иметь потенциал для нецелевых нуклеаз, что делает их потенциально канцерогенными при применении. Наконец, экзогенно экспрессированные нуклеазы обнаруживаются у бактерий, но не у людей или млекопитающих, и, возможно, индуцируют иммунный ответ у пациента, который, с одной стороны, может нанести вред пациенту, а с другой стороны, может вызвать нейтрализацию экзогенно экспрессированных нуклеаз, таким образом, теряя свою надлежащую активность или препятствуя дальнейшему терапевтическому вмешательству.

В 2017 году группа Фэнг Чжана сообщила о способе редактирования РНК под названием REPAIR (RNA Editing for Programmable A to I Replacement - редактирование РНК для программного замещения А на I) (RNA editing with CRISPR-Cas13, Cox et al., 2017). Этим способом также можно достигнуть целевого редактирования РНК А-в-I с помощью экзогенно экспрессированного слитого белка Cas13-ADAR и одиночной направляющей РНК (sgRNA). Однако этот способ, как и CRISPR, все еще основывается на экспрессии экзогенного белка и не может решать проблемы, вызванные экспрессией экзогенного белка.

В январе 2019 года группа Торстена Стаффорста сообщила о способе редактирования нуклеиновых кислот под названием RESTORE (recruiting endogenous ADAR to specific trans for oligonucleotide-mediated RNA editing, Merkle et al., 2019). Этот способ не основан на экзогенных белках. Однако, с одной стороны, RESTORE может достичь высокой эффективности редактирования только в присутствии ИФН- γ (интерферон гамма), что является ключевым фактором в определении развития и тяжести аутоиммунитета (Interferon- γ and systemic autoimmunity, Pollard et al., 2013), тем самым препятствуя применению данного способа в медицинской области. С другой стороны, в RESTORE также используется направляющая РНК, которая представляет собой химически синтезированный олигонуклеотид, и она должна быть искусственно внедрена с большим количеством химических модификаций для обеспечения ее стабильности.

В 2019 году в патентных заявках PCT/CN2019/110782 и PCT/CN2020/084922 была предложена спроектированная модифицированная РНК. Указанная РНК частично комплементарна целевому транскрипту для рекрутирования природной ADAR1 или ADAR2 с целью превращения аденозина в инозин в определенном сайте на РНК-мишени. Способ называется «LEAPER (применение эндогенной ADAR для программируемого редактирования РНК)», а РНК для рекрутинга ADAR может называться «дРНК» или «арРНК». ДРНК содержит комплементарную последовательность РНК, которая гибридизуется с РНК-мишенью и может рекрутировать аденозиндезаминазу, действующую на РНК (ADAR), для дезаминирования целевого аденозина (А) в РНК-мишени.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Учитывая мутации G-в-A в патогенном гене IDUA, которые вызывают синдром Гурлера, особенно мутацию NM_000203.4(IDUA)-c.1205G-A(p.Trp402Ter), которая составляет самую высокую долю, в настоящей заявке предлагается новое техническое решение для точного редактирования сайта мутации на РНК-мишени.

В частности, в настоящей заявке по меньшей мере предлагаются следующие технические решения.

1. Способ целевого редактирования РНК-мишени в клетке-мишени на основе LEAPER, где РНК-мишень представляет собой РНК, содержащую мутацию G-в-A в транскрипте гена IDUA, и способ включает:

доставку конструкции, содержащей рекрутирующую аденозиндезаминазу РНК (арРНК), для редактирования РНК-мишени или конструкции для кодирования арРНК в клетку-мишень, причем арРНК содержит комплементарную последовательность РНК, которая гибридизуется с РНК-мишенью и способна рекрутировать аденозиндезаминазу, действующую на РНК (ADAR), для дезаминирования целевого аденозина (A) в РНК-мишени.

2. Способ по п. 1, где арРНК вводит основание C, A, U или G, которое спарено с целевым A.

В некоторых вариантах осуществления арРНК содержит основание C, которое спаривается с целевым A. В некоторых вариантах осуществления арРНК содержит основание A, которое спаривается с целевым A. В некоторых вариантах осуществления арРНК содержит основание U, которое спаривается с целевым A.

3. Способ по п. 1 или 2, где длина арРНК составляет примерно 151-61 нт (нуклеотид), 131-66 нт, 121-66 нт, 111-66 нт, 91-66 нт или 81-66 нт. В настоящей заявке раскрывается и охватывается любое натуральное число в пределах числовых диапазонов.

4. Способ по п. 3, где расстояние между нацеливающим основанием в арРНК и 3'-концом составляет 45-5 нт, 40-5 нт, 35-10 нт, 25-15 нт или 24-11 нт. В настоящей заявке раскрывается и охватывается любое натуральное число в пределах числовых диапазонов.

5. Способ по п. 3 или 4, где расстояние между нацеливающим основанием в арРНК и 5'-концом составляет 80-30 нт, 70-35 нт, 60-40 нт, 55-35 нт или 55-45 нт. В настоящей заявке раскрывается и охватывается любое натуральное число в пределах числовых диапазонов.

6. Способ по любому из пп. 1-5, где клетка-мишень представляет собой клетку человека.

7. Способ по любому из пп. 1-6, где РНК-мишень представляет собой РНК, содержащую сайт мутации NM_000203.4(IDUA)-с.1205G-A(р.Trp402Ter).

8. Способ по любому из пп. 1-7, где арРНК содержит любую из следующих последовательностей: SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31 и SEQ ID NO: 34.

9. Способ по любому из пп. 1-5, где арРНК содержит любую из следующих последовательностей: SEQ ID NO: 44 и SEQ ID NO: 52.

10. Способ по любому из пп. 1-9, где арРНК является химически модифицированной.

11. Способ по п. 10, где указанная химическая модификация включает 2'-O'-метилирование (2'-ОМе) или модификацию тиофосфата.

12. Способ по п. 11, где указанная химическая модификация представляет собой одну или более модификаций, выбранных из группы, состоящей из:

модификации 2'-ОМе на каждом из первых трех нуклеотидов и последних трех нуклеотидов в последовательности арРНК;

тиофосфатной связи между нуклеотидами первых трех нуклеотидов и последних трех нуклеотидов;

модификации 2'-ОМе на всех основаниях U в последовательности арРНК;

модификации 2'-ОМе на основании А, которое является 3'-основанием, ближайшим к нацеливаемому основанию;

модификации 2'-ОМе на основании С, которое является 5'-основанием, ближайшим к нацеливаемому основанию;

тиофосфатной связи между нацеливающим основанием с его 3'-ближайшим основанием и 5'-ближайшим основанием, соответственно;

модификации 2'-ОМе на каждом из первых пяти нуклеотидов и последних пяти нуклеотидов; и

тиофосфатной связи между нуклеотидами первых пяти нуклеотидов и последних пяти нуклеотидов.

В некоторых конкретных вариантах осуществления химическая модификация выбрана из любой одной или более модификаций, выбранных из группы, состоящей из:

СМ1, которая обозначает, что первые три нуклеотида и последние три нуклеотида в последовательности арРНК по отдельности подвергаются модификации 2'-ОМе, причем первые три нуклеотида и последние три нуклеотида связаны через тиофосфатные связи между нуклеотидами, и при этом все основания U в последовательности арРНК подвергаются модификации 2'-ОМе;

СМ2, которая обозначает, что первые три нуклеотида и последние три нуклеотида в последовательности арРНК по отдельности подвергаются модификации 2'-ОМе, причем первые три нуклеотида и последние три нуклеотида связаны через тиофосфатные связи между нуклеотидами, и при этом 3'-ближайшее основание нацеливающего основания представляет собой основание А, подвергнутое модификации 2'-ОМе;

СМ3, которая обозначает, что первые три нуклеотида и последние три нуклеотида в последовательности по отдельности подвергаются модификации 2'-ОМе, причем первые три нуклеотида и последние три нуклеотида связаны через тиофосфатные связи между нуклеотидами, и при этом 5'-ближайшее основание нацеливающего основания представляет собой основание С, подвергнутое модификации 2'-ОМе;

СМ4, которая обозначает, что первые три нуклеотида и последние три нуклеотида в последовательности по отдельности подвергаются модификации 2'-ОМе, причем первые три нуклеотида и последние три нуклеотида связаны через тиофосфатные связи между нуклеотидами, и при этом нацеливающее основание связано с 3'-ближайшим основанием и 5'-ближайшим основанием нацеливающего основания, соответственно, через тиофосфатные связи; и

СМ6, которая обозначает, что первые пять нуклеотидов и последние пять нуклеотидов в последовательности по отдельности подвергаются модификации 2'-ОМе, и причем первые пять нуклеотидов и последние пять нуклеотидов связаны через тиофосфатные связи между нуклеотидами.

13. Способ по любому из пп. 1-9, где конструкция для кодирования арРНК представляет собой линейную цепь нуклеиновой кислоты, вирусный вектор или плазмиду.

14. Способ по п. 13, где вирусный вектор представляет собой вектор аденоассоциированного вируса (AAV) или вектор экспрессии лентивируса.

15. Способ по любому из пп. 1-14, где способ доставки представляет собой электротрансфекцию, липофекцию или доставку или инфицирование липидной наночастицей (LNP - lipid nanoparticle).

16. Способ по п. 15, где конструкция, содержащая рекрутирующую аденозиндезаминазу РНК (арРНК), используемую для редактирования РНК-мишени, или конструкция для кодирования арРНК доставляется в клетку-мишень через LNP.

17. Способ по любому из пп. 1-16, где концентрация доставки арРНК равна или выше 2,5 нМ, 5 нМ, 10 нМ, 15 нМ или 20 нМ.

В вышеуказанных вариантах осуществления клетка-мишень содержит гепатоцит или фибробласт.

18. арРНК, используемая для целевого редактирования РНК-мишени в клетке-мишени на основе LEAPER, или кодирующая последовательность арРНК, где арРНК содержит или состоит из любой из следующих последовательностей: SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 44 и SEQ ID NO: 52.

19. Плазмида, вирусный вектор, липосома или липидная наночастица, которая содержит арРНК или кодирующую последовательность арРНК по п. 18.

20. Композиция, препарат, набор или биологический продукт, которая содержит арРНК или кодирующую последовательность арРНК по п. 18, или содержит плазмиду, вирусный вектор, липосому или липидную наночастицу по п. 19.

21. Способ лечения МПС II у индивидуума, который включает коррекцию мутации G-в-A, связанной с МПС II, в клетке-мишени индивидуума способом по любому из пп. 1-17.

22. Способ по п. 20, где мутация представляет собой мутацию NM_000203.4(IDUA)-с.1205G-A(р.Trp402Ter).

23. Способ по п. 20 или 21, где арРНК вводят с частотой каждые 21 день или чаще, каждые 17 дней или чаще, каждые 14 дней или чаще или каждые 10 дней или чаще.

В некоторых вариантах осуществления настоящая заявка также относится к применению любой из следующих последовательностей при получении лекарственного средства для лечения МПС II: SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 44 и SEQ ID NO: 52.

Технические решения по настоящей заявке могут быть использованы для безопасного и эффективного осуществления редактирования РНК А-в-I в клетке-мишени (например, гепатоците и фибробласте.) *in vivo*, благодаря чему точно восстанавливается сайт патогенной мутации, например, мутации NM_000203.4(IDUA)-с.1205G-A(р.Trp402Ter), и восстанавливается нормальная экспрессия белков, кодируемых РНК *in vivo*, для достижения цели лечения МПС II.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ СОПУТСТВУЮЩИХ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

На фиг. 1 показано обнаружение генотипа IDUA клеток GM06214.

На фиг. 2 показан тест на электротрансфекцию клеток.

На фиг. 3А показана конструкция арРНК, специфичных к пре-мРНК (предшественница матричной РНК) и мРНК IDUA, и обнаружение клеточной функции после редактирования; а на фиг. 3В показана конструкция арРНК, специфичных к пре-мРНК и

мРНК IDUA, и обнаружение эффективности клеточного редактирования.

На фиг. 4А показана конструкция клеточной линии IDUA-репортер; а на фиг. 4В показано обнаружение эффективности редактирования арРНК разных длин (симметрично усеченные) на 293Т-IDUA-Репортер.

На фиг. 5А и фиг. 5В показано обнаружение активности фермента и эффективность редактирования в клетках GM06214, которые трансфицированы арРНК различных длин (симметрично усеченные) в разные моменты времени.

На фиг. 6 показано обнаружение активности фермента IDUA и эффективность редактирования в клетках GM06214, которые трансфицированы арРНК (симметрично усеченные, усеченные с 3'-конца и усеченные с 5'-конца) липофектаминоом RNAiMAX.

На фиг. 7А показан выбор оптимальной длины с помощью обнаружения активности фермента в клетках GM06214, которые трансфицированы арРНК, нацеленными на сайт мутации IDUA человека, где длина арРНК предпочтительно составляет от 55нт-с-25нт до 55нт-с-10нт, т. е. основания на 3'-конце уменьшаются один за другим; и на фиг. 7В показан выбор оптимальной длины с помощью обнаружения активности фермента в клетках MEF мыши MSPI (эмбриональные фибробласты мыши MSPI), которые трансфицированы арРНК, нацеленными на сайт мутации IDUA мыши, где длина арРНК составляет от 55нт-с-55нт до 55нт-с-10нт, т. е. основания на 3'-конце уменьшаются на каждые 5 оснований.

На фиг. 8А показан выбор арРНК оптимальной длины с помощью постепенного усечения длины 5'-конца в условиях двух предпочтительных длин 3'-конца; и на фиг. 8В показаны влияния арРНК, у которых длина 3'-конца фиксирована на 14 нт, а длина 5'-конца постепенно отсекается основанием за основанием, на активность фермента, причем арРНК оптимальной длины отсеивается в соответствии с фиг. 8А и фиг. 8В.

На фиг. 9 показано сравнение влияния различных химических модификаций на эффективность редактирования (отражаемую ферментативной активностью) арРНК с 2 предпочтительными длинами.

На фиг. 10А-10D показана эффективность редактирования арРНК, нацеленных на мРНК IDUA человека и мыши, и способность продуцировать функциональные белки IDUA после редактирования в условиях предпочтительной длины, предпочтительной комбинации химической модификации и различных концентраций арРНК.

На фиг. 11А-11D показана активность фермента IDUA в клетках человека или мыши в различные моменты времени после однократной трансфекции в условиях предпочтительной длины и предпочтительной комбинации химической модификации.

На фиг. 12А и фиг. 12В показана эффективность редактирования арРНК, нацеленной

на сайт, после доставки арРНК в первичные клетки печени человека и мышцы различными способами.

На фиг. 13 показана эффективность редактирования арРНК, нацеленной на IDUA, после доставки арРНК в клетки печени человека и мышцы, полученные с помощью первичной клеточной культуры через LNP.

На фиг. 14 показана эффективность редактирования IDUA в клетках печени мыши через 24 ч после введения выбранной арРНК (SEQ ID NO: 52), нацеленной на мутацию IDUA мыши, которая получена в LNP, путем инъекции в хвостовую вену в различных концентрациях.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Определение

Редактирование РНК является естественным процессом, происходящим в эукариотических клетках. Редактирование РНК включает преобразование основания А (аденозин) в основание I (инозин) в РНК, которое происходит до трансляции белка и после транскрипции ДНК, во время трансляции инозин идентифицируется как G, и редактирование РНК А-в-I диверсифицирует транскриптом. Общее количество РНК будет увеличено в несколько раз путем точного преобразования молекул РНК. Такое редактирование катализируется аденозиндезаминазой, действующей на РНК (ADAR), поэтому оно называется сайт-направленным редактированием РНК. Редактирование может происходить в кодирующих областях, содержащих последовательности интрона и экзона, или может происходить в некодирующих областях, а редактирование в кодирующих областях может переопределять кодирующие белок последовательности.

В контексте настоящего документа «LEAPER» представляет собой способ, применяющий сконструированную РНК для рекрутирования эндогенного ADAR, применяемого для редактирования РНК, который был описан в WO2020074001A1. В контексте настоящего документа сконструированная РНК относится к рекрутирующей аденозиндезаминазу РНК (арРНК), которая может рекрутировать ADAR или некоторые соединения, содержащие домен ADAR, для дезаминирования целевого аденозина в РНК-мишени.

В контексте настоящего документа термин «аденозиндезаминаза, действующая на РНК (ADAR)» относится к классу аденозиндезаминазы, широко экспрессируемой в тканях эукариот (включая млекопитающих, например людей), которые могут катализировать превращение аденозина (А) в инозин (I) в молекуле РНК. Однако в процессе синтеза белков в

эукариотах I обычно транслируется в G.

В контексте настоящего документа «комплементарность» нуклеиновых кислот относится к способности нуклеиновой кислоты образовывать водородные связи с другой нуклеиновой кислотой путем обычного спаривания оснований по Уотсону-Крику. Процент комплементарности относится к проценту остатков в молекуле нуклеиновой кислоты, которые могут образовывать водородные связи с остатками в другой молекуле нуклеиновой кислоты (т. е. спаривание оснований по Уотсону-Крику). Например, среди 10 остатков молекулы нуклеиновой кислоты примерно 5, 6, 7, 8, 9 или 10 остатков могут образовывать водородные связи с остатками в другой молекуле нуклеиновой кислоты, что означает, что процент комплементарности двух молекул нуклеиновой кислоты составляет примерно 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % или 100 %. «Полная комплементация» обозначает, что все непрерывные остатки в нуклеотидной последовательности могут образовывать водородные связи с таким же количеством непрерывных остатков в другой нуклеотидной последовательности. В контексте настоящего документа «существенно комплементарный» обозначает, что в примерно 40, 50, 60, 70, 80, 100, 150, 200, 250 или более нуклеотидных областях процент комплементарности составляет по меньшей мере примерно 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 % или 99 %, или обозначает, что две нуклеиновые кислоты гибридизуются в строгих условиях. Для единственного основания или единственного нуклеотида спаривание А с Т или U и спаривание С с G или I по принципу спаривания оснований по Уотсону-Крику можно назвать комплементацией или совместимостью, и наоборот. В противном случае спаривание оснований следует называть некомплементацией или несовместимостью.

«Гибридизация» относится к процессу, в котором один или более полинуклеотидов реагируют с образованием соединения, и указанное соединение стабилизируется водородными связями между основаниями нуклеотидных остатков. Водородные связи также могут быть образованы путем спаривания оснований по Уотсону-Крику, Хугстиновского спаривания или любыми другими специфичными к последовательностям способами. Последовательность, которая может гибридизоваться с данной последовательностью, называется «комплементарной последовательностью» данной последовательности.

В контексте настоящего документа термин «электротрансфекция» относится к электропорационной трансфекции, при которой клетки подвергаются воздействию электрического поля в течение от микросекунд до миллисекунд, при этом на клеточной мембране временно формируются щели или отверстия, а макромолекулы, такие как ДНК, доставляются в клетки.

В контексте настоящего документа термин «липофекция (Lipo)» относится к способу трансфекции с применением липосомы в качестве вектора доставки *in vivo* или *in vitro*. Липосомы включают нейтральные липосомы и катионные липосомы. Для нейтральной липосомы макромолекулу, такую как нуклеиновая кислота, оборачивают липидной мембраной, а затем доставляют к клеточной мембране через липидную мембрану, а для катионной липосомы, которая является положительно заряженной, макромолекулу, подлежащую доставке, заранее не встраивают в катионную липосому, при этом макромолекула, которая является отрицательно заряженной, автоматически связывается с положительно заряженной липосомой с образованием макромолекулярно-катионного липосомного соединения, которое адсорбируется на поверхность клеточной мембраны, которая является отрицательно заряженной, и доставляется в клетку путем эндоцитоза.

В контексте настоящего документа термин «доставка липидных наночастиц (LNP)» относится к трансмембранной доставке макромолекулы, такой как нуклеиновая кислота и белок, через липидную наночастицу. Липидные наночастицы относятся к частицам, синтезированным путем смешивания двух фаз, которые содержат этанольную фазу, содержащую ионизируемые липиды, вспомогательные фосфолипиды, холестерин и ПЭГ (полиэтиленгликолевые) липиды, и кислотную водную фазу, содержащую макромолекулы, такие как нуклеиновые кислоты и белки. Например, РНК, обернутая LNP, может быть доставлена в цитоплазму путем эндоцитоза.

В настоящем документе мутация NM_000203.4(IDUA)-c.1205G-A(p.Trp402Ter) относится к мутации G-в-A на сайте 1205 в транскрипте № 000203.4 гена IDUA, которая преобразует кодирующую последовательность триптофана (Trp) на сайте 402 пептидной цепи, транслируемой транскриптом, в концевой кодон (Ter), в результате чего в окончательно транслируемой пептидной цепи отсутствуют все аминокислоты после сайта 402, и она теряет ферментативную активность IDUA. Такая мутация приводит к дефициту активной α -L-идурамидазы, что влияет на деградацию гликозаминогликанов в лизосомах клеток, и в конечном итоге вызывает тератогенность и даже смерть пациентов. Однако технические решения настоящей заявки могут обратить мутацию во время транскрипции для восстановления ферментативной активности IDUA.

В контексте настоящего документа термин «РНК-мишень» относится к РНК-мишени, подлежащей редактированию, которая содержит аденозин (A), подлежащий редактированию. РНК-мишень может представлять собой зрелую мРНК или может представлять собой предшественницу мРНК. В настоящей заявке РНК-мишень более предпочтительно представляет собой предшественницу мРНК. В настоящем документе

клетка, содержащая «РНК-мишень», называется клеткой-мишенью. Аденозин, подлежащий редактированию, называется «целевым основанием», «целевым аденозином» или «целевым А». В настоящей заявке «целевое основание», «целевой аденозин» и «целевой А» могут быть использованы взаимозаменяемо. Основание, примыкающее к целевому аденозину на 5'-конце РНК-мишени, называют «5'-соседним основанием»; основание, примыкающее к целевому аденозину, на 3'-конце РНК-мишени называют «3'-соседним основанием»; и триплет основания, состоящий из целевого основания, 3'-соседнего основания и 5'-соседнего основания, в настоящем документе называют «целевым триплетом основания». Когда арРНК гибридизуется с РНК-мишенью, основание, соответствующее целевому основанию, на арРНК называют «нацеливающим основанием»; основание, примыкающее к нацеливающему основанию, на 5'-конце арРНК называют «5'-ближайшим основанием»; основание, примыкающее к нацеливающему основанию, на 3'-конце арРНК называют «3'-ближайшим основанием», а триплет основания, состоящий из нацеливающего основания, 3'-ближайшего основания и 5'-ближайшего основания, в настоящем документе называют «нацеливающим триплетом основания».

В контексте настоящего документа термин «конструкция» относится к вектору нуклеиновой кислоты, содержащему определенную нуклеотидную последовательность, которая может представлять собой линейную молекулу нуклеиновой кислоты, плазмиду или вирусный вектор. Молекула нуклеиновой кислоты может представлять собой одноцепочечную или двухцепочечную молекулу. Нуклеотидная последовательность может представлять собой последовательность ДНК или последовательность РНК. В некоторых вариантах осуществления нуклеотидная последовательность может работать без того, чтобы подвергаться транскрипции, трансляции или экспрессии. В некоторых вариантах осуществления нуклеотидная последовательность представляет собой последовательность ДНК и работает в виде молекул РНК, которые генерируются путем транскрибирования нуклеотидной последовательности. В некоторых вариантах осуществления нуклеотидная последовательность представляет собой последовательность РНК, и она работает в виде полипептидов или белков, которые генерируются путем трансляции нуклеотидной последовательности. В некоторых вариантах осуществления нуклеотидная последовательность представляет собой последовательность ДНК, и она работает в виде белков, полученных путем транскрибирования и трансляции нуклеотидной последовательности. Конструкция может быть получена в виде вируса, липидной наночастицы или экзосомы, а затем доставлена в клетку-мишень, или может быть доставлена в клетку-мишень путем электротрансформации, микроинъекции или химического

превращения.

В контексте настоящего документа термин «доставка» относится к введению биомакромолекул, таких как нуклеиновые кислоты и белки, в клеточную мембрану определенными способами. Способы «доставки» включают электротрансфекцию, липофекцию, доставку липидных наночастиц, доставку вирусов и доставку экзосом.

Термин «модификация», применяемый в настоящей заявке, обозначает, что одно или более свойств или функций нуклеиновой кислоты или белка изменяются химическим или биологическим способом. Например, состав или структура нуклеиновой кислоты или белка изменяется посредством генной инженерии.

Если не указано иное, все технические термины и научные термины, применяемые в настоящем документе, имеют те же значения, которые обычно понимаются специалистами в данной области техники, к которой относится настоящая заявка.

Способ редактирования РНК

В настоящей заявке предложен способ целевого редактирования РНК-мишени, содержащей мутацию G-в-A в гене IDUA, в клетке-мишени на основе LEAPER, который включает: доставляемую в клетку-мишень конструкцию, содержащую рекрутирующую аденозиндезаминазу РНК (арРНК), используемую для редактирования РНК-мишени, или конструкцию для кодирования арРНК, причем арРНК содержит комплементарную последовательность РНК, которая гибридизуется с РНК-мишенью, и может рекрутировать аденозиндезаминазу, действующую на РНК (ADAR), для дезаминирования целевого аденозина (A) в РНК-мишени. В некоторых вариантах осуществления РНК-мишень представляет собой предшественницу мРНК. В некоторых вариантах осуществления РНК-мишень представляет собой зрелую мРНК. В некоторых вариантах осуществления РНК-мишень представляет собой транскрибируемую РНК, содержащую сайт мутации NM_000203.4(IDUA)-c.1205G-A(p.Trp402Ter) в гене IDUA.

В некоторых вариантах осуществления арРНК содержит основание C, A, U или G, которое спаривается с целевым A. Основания, спаренные с целевым A, сортируются по приоритету как C > A > U > G. Т. е., в условиях одинаковой длины арРНК, одинакового расстояния между нацеливающими основаниями и 5'-концом, одинакового расстояния между нацеливающими основаниями и 3'-концом и полностью одинаковой последовательностью арРНК, за исключением нацеливающих оснований, нацеливающие основания сортируются по приоритету как C > A > U > G. Если нацеливающее основание представляет собой C, арРНК может быть выражена в виде X нт-с-Y нт, где X обозначает,

что расстояние между нацеливающим основанием и 5'-концом составляет X нт, Y обозначает, что расстояние между нацеливающим основанием и 3'-концом составляет Y нт, и X и Y может быть любым натуральным числом.

В некоторых вариантах осуществления клетка-мишень представляет собой эукариотическую клетку. В некоторых вариантах осуществления клетка-мишень представляет собой клетку млекопитающего. В некоторых вариантах осуществления клетка-мишень представляет собой гепатоцит или фибробласт. В некоторых вариантах осуществления клетка-мишень представляет собой клетку человека или мыши.

В некоторых вариантах осуществления длина арРНК составляет примерно 151-61 нт, 131-66 нт, 121-66 нт, 111-66 нт, 91-66 нт или 81-66 нт. В некоторых вариантах осуществления расстояние между нацеливающим основанием в арРНК и 3'-концом составляет 45-5 нт, 40-5 нт, 35-10 нт, 25-15 нт или 24-11 нт. В некоторых вариантах осуществления расстояние между нацеливающим основанием в арРНК и 5'-концом составляет 80-30 нт, 70-35 нт, 60-40 нт, 55-35 нт или 55-45 нт. Расстояние между нацеливающим основанием и 3'-концом относится к количеству оснований от 3'-ближайшего основания нацеливающего основания до последнего основания на 3'-конце; и расстояние между нацеливающим основанием и 5'-концом относится к количеству оснований от 5'-ближайшего основания нацеливающего основания до последнего основания на 5'-конце.

В некоторых вариантах осуществления, если клетка-мишень представляет собой клетку человека, и РНК-мишень транскрибируется РНК, содержащей сайт мутации NM_000203.4(IDUA)-c.1205G-A(p.Trp402Ter) в гене IDUA, полная длина арРНК равна или более 66 нт, например, примерно 121-66 нт, 111-66 нт, 101-66 нт, 91-66 нт и 81-66 нт, т. е. полная длина арРНК представляет собой любое натуральное число, выбранное из вышеуказанных диапазонов длин, такое как 67 нт, 68 нт, 69 нт, 70 нт, 71 нт, 72 нт, 73 нт, 74 нт, 75 нт, 76 нт, 77 нт, 78 нт, 79 нт, 80 нт, 81 нт, 82 нт, 83 нт, 84 нт, 85 нт, 86 нт, 87 нт, 88 нт, 89 нт, 90 нт, 91 нт, 95 нт, 100 нт, 110 нт, 115 нт и 120 нт. В некоторых вариантах осуществления расстояние между нацеливающим основанием в арРНК и 3'-концом составляет 45-5 нт, 40-5 нт, 35-10 нт, 25-15 нт или 24-11 нт, т. е. расстояние между нацеливающим основанием в арРНК и 3'-концом представляет собой любое натуральное число, выбранное из вышеуказанных диапазонов расстояний, такое как 12 нт, 13 нт, 14 нт, 16 нт, 17 нт, 18 нт, 19 нт, 20 нт, 21 нт, 22 нт и 23 нт. В некоторых вариантах осуществления расстояние между нацеливающим основанием в арРНК и 5'-концом составляет 80-30 нт, 70-35 нт, 60-40 нт, 55-35 нт или 55-45 нт, т. е. расстояние между нацеливающим основанием в арРНК и 5'-концом представляет собой любое натуральное число, выбранное из

вышеуказанных диапазонов расстояний, такое как 46 нт, 47 нт, 48 нт, 49 нт, 50 нт, 51 нт, 52 нт, 53 нт и 54 нт. В некоторых вариантах осуществления арРНК содержит любую из следующих последовательностей: SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31 и SEQ ID NO: 34.

В некоторых вариантах осуществления клетка-мишень представляет собой клетку мышцы (например, клетку мышцы W392X), и РНК-мишень транскрибируется РНК, содержащей мутацию, соответствующую мутации W402X человека, в гене IDUA. В некоторых вариантах осуществления клетка-мишень представляет собой клетку мышцы W392X. В некоторых вариантах осуществления длина арРНК составляет примерно 121-53 нт, 111-61 нт, 101-61 нт, 91-61 нт, 81-61 нт, 111-66 нт или 105-66 нт, т. е. полная длина арРНК представляет собой любое натуральное число, выбранное из вышеуказанных диапазонов длин, такое как 67 нт, 68 нт, 69 нт, 70 нт, 71 нт, 72 нт, 73 нт, 74 нт, 75 нт, 76 нт, 77 нт, 78 нт, 79 нт, 80 нт, 81 нт, 82 нт, 83 нт, 84 нт, 85 нт, 86 нт, 87 нт, 88 нт, 89 нт, 90 нт, 91 нт, 95 нт, 100 нт, 110 нт, 115 нт и 120 нт. В некоторых вариантах осуществления расстояние между нацеливающим основанием в арРНК и 3'-концом составляет 55-10 нт или 50-10 нт, т. е. расстояние между нацеливающим основанием в арРНК и 3'-концом представляет собой любое натуральное число, выбранное из вышеуказанных диапазонов длин, такое как 11 нт, 12 нт, 13 нт, 14 нт, 16 нт, 17 нт, 18 нт, 19 нт, 20 нт, 21 нт, 22 нт, 23 нт, 24 нт, 25 нт, 26 нт, 27 нт, 28 нт, 29 нт, 30 нт, 31 нт, 32 нт, 33 нт, 34 нт, 35 нт, 35 нт, 37 нт, 38 нт, 39 нт, 40 нт, 41 нт, 42 нт, 43 нт, 44 нт, 45 нт, 46 нт, 47 нт, 48 нт, 49 нт и 50 нт. В некоторых вариантах осуществления расстояние между нацеливающим основанием в арРНК и 5'-концом составляет 80-30 нт, 70-35 нт, 60-40 нт, 55-35 нт или 55-45 нт, т. е. расстояние между нацеливающим основанием в арРНК и 5'-концом представляет собой любое натуральное число, выбранное из вышеуказанных диапазонов расстояний, такое как 33 нт, 36 нт, 47 нт, 46 нт, 47 нт, 48 нт, 49 нт, 50 нт, 51 нт, 52 нт, 53 нт, 54 нт, 60 нт, 65 нт и 75 нт. В некоторых вариантах осуществления арРНК содержит любую из следующих последовательностей: SEQ ID NO: 44 и SEQ ID NO: 52.

В некоторых вариантах осуществления арРНК является химически модифицированной. В некоторых вариантах осуществления химическая модификация включает 2-O'-метилирование и/или модификацию тиофосфата. В некоторых вариантах осуществления химическая модификация выбрана из любой одной или более из:

первые три нуклеотида и последние три нуклеотида в последовательности соответственно подвергаются модификации 2'-ОМе;

первые три нуклеотида и последние три нуклеотида соответственно связаны через

тиофосфатные связи;

все основания U в последовательности подвергаются модификации 2'-ОМе;

3'-ближайшее основание нацеливающего основания представляет собой А, подвергающееся модификации 2'-ОМе;

5'-ближайшее основание нацеливающего основания представляет собой С, подвергающееся модификации 2'-ОМе;

нацеливающее основание связано с 3'-ближайшим основанием и 5'-ближайшим основанием нацеливающего основания, соответственно, через тиофосфатные связи;

первые пять нуклеотидов и последние пять нуклеотидов, соответственно, подвергаются модификации 2'-ОМе; и

первые пять нуклеотидов и последние пять нуклеотидов, соответственно, связаны через тиофосфатные связи.

Как описано в настоящем документе, конструкция для кодирования арРНК представляет собой конструкцию, содержащую кодирующую последовательность арРНК. В некоторых вариантах осуществления арРНК получают путем транскрибирования конструкции для кодирования арРНК после доставки конструкции для кодирования арРНК в клетку-мишень. В некоторых вариантах осуществления конструкция для кодирования арРНК представляет собой линейную цепь нуклеиновой кислоты, вирусный вектор или плазмиду. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой вектор аденоассоциированного вируса (AAV) или лентивирусный вектор. В некоторых вариантах осуществления после доставки в клетку-мишень конструкция для кодирования арРНК встраивает кодирующую последовательность арРНК в геном клетки-мишени с помощью гомологичной рекомбинации или нехомологичной рекомбинации таким образом, чтобы непрерывно генерировать арРНК путем транскрипции. В некоторых вариантах осуществления после доставки в клетку-мишень, конструкция для кодирования арРНК обеспечивает возможность существования кодирующей последовательности арРНК как части свободной нуклеиновой кислоты в клетке-мишени, так что кодирующая последовательность арРНК может генерировать арРНК путем транскрипции в течение определенного периода времени.

В некоторых вариантах осуществления способ доставки представляет собой электротрансфекцию, липофекцию или доставку или инфицирование липидной наночастицы (LNP). В некоторых вариантах осуществления, если клетка-мишень представляет собой гепатоцит, способ доставки представляет собой доставку LNP. В некоторых вариантах осуществления, если клетка-мишень представляет собой фибробласт, способ доставки

представляет собой липофекцию. В некоторых вариантах осуществления концентрация доставки арРНК равна или выше 2,5-5 нМ и предпочтительно равна или выше 10-20 нМ, например, равна или выше 15 нМ. В настоящей заявке концентрация доставки относится к содержанию арРНК в одной объемной единице системы доставки, где одна объемная единица арРНК и клетка-мишень расположены после доставки конструкции арРНК в клетку-мишень. Система доставки содержит арРНК или ее конструкцию, клетку-мишень и жидкую матрицу вокруг арРНК и клетки-мишени. В некоторых вариантах осуществления жидкая матрица может представлять собой среду для культивирования клеток, PBS (фосфатно-солевой буферный раствор) или другие растворы, которые имеют такое же осмотическое давление, как и в цитоплазме, и могут поддерживать стабильные условия выживаемости клеток. В некоторых вариантах осуществления система доставки дополнительно содержит реагент для ускорения доставки.

арРНК

В настоящей заявке также предложена арРНК, которая может быть применена для целевого редактирования РНК-мишени на основе LEAPER, такая как транскрибированная РНК, содержащая сайт мутации NM_000203.4(IDUA)-c.1205G-A(p.Trp402Ter), в клетке-мишени, для дезаминирования целевого А в РНК-мишени в инозин (I). В последующем процессе трансляции клетки-мишени I будет идентифицирован как G, так что мутация G > A может быть восстановлена до G, а РНК-мишень может быть транслирована в правильный белок после редактирования посредством арРНК. В некоторых вариантах осуществления РНК-мишень представляет собой предшественницу мРНК. В некоторых вариантах осуществления РНК-мишень представляет собой зрелую мРНК.

В некоторых вариантах осуществления арРНК имеет основание (нацеливающее основание) C, A, U или G, которое спаривается с целевым A, и основания сортируются по эффективности редактирования в виде C > A > U > G. В некоторых вариантах осуществления в дополнение к нацеливающему основанию другие основания в арРНК могут быть спарены с РНК-мишенью комплементарным образом. В некоторых вариантах осуществления, за исключением нацеливающего основания, одно или более оснований в арРНК неправильно спариваются с РНК-мишенью.

В некоторых вариантах осуществления клетка-мишень представляет собой эукариотическую клетку. В некоторых вариантах осуществления клетка-мишень представляет собой клетку млекопитающего. В некоторых вариантах осуществления клетка-мишень представляет собой гепатоцит или фибробласт. В некоторых вариантах

осуществления клетка-мишень представляет собой клетку человека или мыши (например, клетку мыши W392X).

В некоторых вариантах осуществления длина арРНК составляет примерно 151-61 нт, 131-66 нт, 121-66 нт, 111-66 нт, 91-66 нт или 81-66 нт. В некоторых вариантах осуществления расстояние между нацеливающим основанием в арРНК и 3'-концом составляет 45-5 нт, 40-5 нт, 35-10 нт, 25-15 нт или 24-11 нт. В некоторых вариантах осуществления расстояние между нацеливающим основанием в арРНК и 5'-концом составляет 80-30 нт, 70-35 нт, 60-40 нт, 55-35 нт или 55-45 нт. Расстояние между нацеливающим основанием и 3'-концом относится к количеству оснований от 3'-ближайшего основания нацеливающего основания до последнего основания на 3'-конце; и расстояние между нацеливающим основанием и 5'-концом относится к количеству оснований от 5'-ближайшего основания нацеливающего основания до последнего основания на 5'-конце.

В некоторых вариантах осуществления, если клетка-мишень представляет собой клетку человека, и РНК-мишень транскрибируется РНК, содержащей сайт мутации NM_000203.4(IDUA)-с.1205G-A(р.Trp402Ter) в гене IDUA, полная длина арРНК равна или выше 66 нт, например, примерно 121-66 нт, 111-66 нт, 101-66 нт, 91-66 нт и 81-66 нт, т. е. полная длина арРНК представляет собой любое натуральное число, выбранное из вышеуказанных диапазонов длин, такое как 67 нт, 68 нт, 69 нт, 70 нт, 71 нт, 72 нт, 73 нт, 74 нт, 75 нт, 76 нт, 77 нт, 78 нт, 79 нт, 80 нт, 81 нт, 82 нт, 83 нт, 84 нт, 85 нт, 86 нт, 87 нт, 88 нт, 89 нт, 90 нт, 91 нт, 95 нт, 100 нт, 110 нт, 115 нт и 120 нт. В некоторых вариантах осуществления расстояние между нацеливающим основанием в арРНК и 3'-концом составляет 45-5 нт, 40-5 нт, 35-10 нт, 25-15 нт или 24-11 нт, т. е. расстояние между нацеливающим основанием в арРНК и 3'-концом представляет собой любое натуральное число, выбранное из вышеуказанных диапазонов расстояний, такое как 12 нт, 13 нт, 14 нт, 16 нт, 17 нт, 18 нт, 19 нт, 20 нт, 21 нт, 22 нт и 23 нт. В некоторых вариантах осуществления расстояние между нацеливающим основанием в арРНК и 5'-концом составляет 80-30 нт, 70-35 нт, 60-40 нт, 55-35 нт или 55-45 нт, т. е. расстояние между нацеливающим основанием в арРНК и 5'-концом представляет собой любое натуральное число, выбранное из вышеуказанных диапазонов расстояний, такое как 46 нт, 47 нт, 48 нт, 49 нт, 50 нт, 51 нт, 52 нт, 53 нт и 54 нт. В некоторых вариантах осуществления арРНК содержит любую из следующих последовательностей: SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31 и SEQ ID NO: 34.

В некоторых вариантах осуществления, если клетка-мишень представляет собой

клетку мышцы (например, клетку мышцы W392X), и РНК-мишень транскрибируется РНК, содержащей мутацию, соответствующую мутации W402X человека, в гене IDUA, длина арРНК составляет примерно 121-53 нт, 111-61 нт, 101-61 нт, 91-61 нт, 81-61 нт, 111-66 нт или 105-66 нт, т. е. полная длина арРНК представляет собой любое натуральное число, выбранное из вышеуказанных диапазонов длин, такое как 67 нт, 68 нт, 69 нт, 70 нт, 71 нт, 72 нт, 73 нт, 74 нт, 75 нт, 76 нт, 77 нт, 78 нт, 79 нт, 80 нт, 81 нт, 82 нт, 83 нт, 84 нт, 85 нт, 86 нт, 87 нт, 88 нт, 89 нт, 90 нт, 91 нт, 95 нт, 100 нт, 110 нт, 115 нт и 120 нт. В некоторых вариантах осуществления расстояние между нацеливающим основанием в арРНК и 3'-концом составляет 55-10 нт или 50-10 нт, т. е. расстояние между нацеливающим основанием в арРНК и 3'-концом представляет собой любое натуральное число, выбранное из вышеуказанных диапазонов длин, такое как 11 нт, 12 нт, 13 нт, 14 нт, 16 нт, 17 нт, 18 нт, 19 нт, 20 нт, 21 нт, 22 нт, 23 нт, 24 нт, 25 нт, 26 нт, 27 нт, 28 нт, 29 нт, 30 нт, 31 нт, 32 нт, 33 нт, 34 нт, 35 нт, 36 нт, 37 нт, 38 нт, 39 нт, 40 нт, 41 нт, 42 нт, 43 нт, 44 нт, 45 нт, 46 нт, 47 нт, 48 нт, 49 нт и 50 нт. В некоторых вариантах осуществления расстояние между нацеливающим основанием в арРНК и 5'-концом составляет 80-30 нт, 70-35 нт, 60-40 нт, 55-35 нт или 55-45 нт, т. е. расстояние между нацеливающим основанием в арРНК и 5'-концом представляет собой любое натуральное число, выбранное из вышеуказанных диапазонов расстояний, такое как 33 нт, 36 нт, 47 нт, 46 нт, 47 нт, 48 нт, 49 нт, 50 нт, 51 нт, 52 нт, 53 нт, 54 нт, 60 нт, 65 нт и 75 нт. В некоторых вариантах осуществления арРНК содержит любую из следующих последовательностей: SEQ ID NO: 44 и SEQ ID NO: 52.

В некоторых вариантах осуществления арРНК получают путем транскрибирования и экспрессии конструкции для кодирования арРНК. В некоторых вариантах осуществления арРНК получают путем транскрибирования и экспрессии конструкции для кодирования арРНК *in vitro* и очистки. В некоторых вариантах осуществления арРНК получают путем прямой экспрессии конструкции для кодирования арРНК *in vivo* и применяют для редактирования. В некоторых вариантах осуществления конструкция представляет собой вирусный вектор, плазмиду или линейную нуклеиновую кислоту. В некоторых вариантах осуществления вирус представляет собой AAV или лентивирус.

В некоторых вариантах осуществления арРНК является химически синтезированной. В некоторых вариантах осуществления арРНК является химически модифицированной. В некоторых вариантах осуществления химическая модификация включает 2-O'-метилирование и/или модификацию тиофосфата. В некоторых вариантах осуществления химическая модификация выбрана из любой одной или более из:

первые три нуклеотида и последние три нуклеотида в последовательности,

соответственно, подвергаются модификации 2`-ОМе;

первые три нуклеотида и последние три нуклеотида, соответственно, связаны через тиофосфатные связи;

все основания U в последовательности подвергаются модификации 2`-ОМе;

3`-ближайшее основание нацеливающего основания представляет собой А, подвергающееся модификации 2`-ОМе;

5`-ближайшее основание нацеливающего основания представляет собой С, подвергающееся модификации 2`-ОМе;

нацеливающее основание связано с 3`-ближайшим основанием и 5`-ближайшим основанием нацеливающего основания, соответственно, через тиофосфатные связи;

первые пять нуклеотидов и последние пять нуклеотидов, соответственно, подвергаются модификации 2`-ОМе; и

первые пять нуклеотидов и последние пять нуклеотидов, соответственно, связаны через тиофосфатные связи.

В некоторых вариантах осуществления химическая модификация выбрана из любой одной или более из:

СМ1, которая обозначает, что первые три нуклеотида и последние три нуклеотида в последовательности, соответственно, подвергаются модификации 2`-ОМе, причем первые три нуклеотида и последние три нуклеотида, соответственно, связаны через тиофосфатные связи, и при этом все основания U в последовательности подвергаются модификации 2`-ОМе;

СМ2, которая обозначает, что первые три нуклеотида и последние три нуклеотида в последовательности, соответственно, подвергаются модификации 2`-ОМе, причем первые три нуклеотида и последние три нуклеотида, соответственно, связаны через тиофосфатные связи, и при этом 3`-ближайшее основание нацеливающего основания представляет собой основание А, подвергнутое модификации 2`-ОМе;

СМ3, которая обозначает, что первые три нуклеотида и последние три нуклеотида в последовательности, соответственно, подвергаются модификации 2`-ОМе, причем первые три нуклеотида и последние три нуклеотида, соответственно, связаны через тиофосфатные связи, и при этом 5`-ближайшее основание нацеливающего основания представляет собой основание С, подвергнутое модификации 2`-ОМе;

СМ4, которая обозначает, что первые три нуклеотида и последние три нуклеотида в последовательности, соответственно, подвергаются модификации 2`-ОМе, причем первые три нуклеотида и последние три нуклеотида, соответственно, связаны через тиофосфатные

связи, и при этом нацеливающее основание связано с 3'-ближайшим основанием и 5'-ближайшим основанием нацеливающего основания, соответственно, через тиофосфатные связи; и

СМ6, которая обозначает, что первые пять нуклеотидов и последние пять нуклеотидов в последовательности, соответственно, подвергаются модификации 2'-ОМе, и первые пять нуклеотидов и последние пять нуклеотидов, соответственно, связываются через тиофосфатные связи.

Конструкция

В настоящей заявке также предложена конструкция для кодирования вышеуказанной арРНК. В некоторых вариантах осуществления конструкция представляет собой вирусный вектор, плазмиду или линейную нуклеиновую кислоту. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой вектор AAV или вектор экспрессии лентивируса.

В настоящей заявке дополнительно предложен вирус, липидная наночастица, липосома, экзосома или клетка, который содержит конструкцию.

Препарат и биологический продукт

В настоящей заявке также предложена композиция, препарат или биологический продукт, которая содержит любую арРНК или конструкцию, описанную выше, и может применяться для редактирования транскрибируемой РНК-мишени, содержащей сайт мутации NM_000203.4(IDUA)-c.1205G-A(p.Trp402Ter) в клетке-мишени, для восстановления нормальных функций гена IDUA. В некоторых вариантах осуществления арРНК или конструкция обернута в липосому. В некоторых вариантах осуществления арРНК или конструкцию получают в липидных наночастицах. В некоторых вариантах осуществления арРНК или конструкцию вводят в организм субъекта с помощью доставки вируса (например, аденоассоциированного вируса или лентивируса).

В некоторых вариантах осуществления препарат, содержащий арРНК, представляет собой терапевтический агент, который может быть введен в организм пациента для лечения заболевания. В некоторых вариантах осуществления способ инфузии представляет собой местную инъекцию, местную перфузию или внутривенную инфузию, или местную перфузию или местную инъекцию. В некоторых вариантах осуществления терапевтический агент находится в форме, применимой для местной инъекции в печень, например, артериальная перфузия в печень. В некоторых вариантах осуществления терапевтический агент находится

в форме, применимой для внутримышечной инъекции. В некоторых вариантах осуществления терапевтический агент находится в форме, применимой для внутривенной инъекции.

Набор

В настоящей заявке также предложен набор, используемый для редактирования РНК-мишени в клетке-мишени, который содержит вышеуказанную арРНК, конструкцию для кодирования арРНК или препарат. Набор может применяться для редактирования транскрибируемой РНК-мишени, содержащей сайт мутации NM_000203.4(IDUA)-c.1205G-A(p.Trp402Ter) в клетке-мишени.

В некоторых вариантах осуществления набор содержит вышеуказанную арРНК или конструкцию для кодирования арРНК и вспомогательное вещество для окрашивания, которые упакованы в различные контейнеры. В некоторых вариантах осуществления вспомогательное вещество для окрашивания представляет собой липидный раствор. Например, вспомогательным веществом для окрашивания является Lipo (липофектамин RNAiMAX, кат. № 13778150), приобретенный у Invitrogen, или реагент, содержащий те же функциональные ингредиенты.

В некоторых вариантах осуществления набор дополнительно содержит инструкцию для ознакомления пользователей с различными ингредиентами и содержимым набора и/или способ применения набора.

Способ лечения

В настоящей заявке дополнительно предложен способ лечения мукополисахаридоза ИИ у индивидуума, который включает: коррекцию мутации G-в-A в гене IDUA, такой как мутация NM_000203.4(IDUA)-c.1205G-A(p.Trp402Ter), в клетке индивидуума указанным выше способом. В некоторых вариантах осуществления заболевания включают синдром Гурлера. В некоторых вариантах осуществления, если индивидуум является человеком, арРНК вводят с частотой каждые 21 день или чаще, каждые 17 дней или чаще, каждые 14 дней или чаще или каждые 10 дней или чаще. В некоторых вариантах осуществления, если индивидуум является мышью, арРНК вводят с частотой каждые 8 дней или чаще. В некоторых вариантах осуществления в способе лечения применяется конструкция для кодирования арРНК, и указанная конструкция может интегрировать кодирующую последовательность арРНК в клетку-мишень, и арРНК вводят один раз.

Способ целевого редактирования РНК на основе LEAPER, предложенный в

настоящей заявке, имеет следующие преимущества.

1. Способ не полагается на экспрессию экзогенных белков, поэтому он позволяет избегать затруднения в загрузке и доставке *in vivo* через вирусные векторы благодаря большой молекулярной массе белков, избегать нецелевого эффекта, вызванного сверхэкспрессией экзогенных белков, избегать иммунного ответа и повреждения организма, вызванного экспрессией экзогенных белков, и избегать сбоя редактирования генов, вызванного нейтрализацией экзогенных ферментов, используемых для редактирования, или эффекторных белков с антителами, уже существующими в организме.

2. Управляемый ферментами сайт-специфический способ редактирования РНК, предложенный в настоящей заявке, отличается от редактирования ДНК, при этом редактирование РНК является обратимым и контролируемым. Заболевания можно лечить, а функции белков и РНК можно изучать путем кодирования аминокислотных кодонов. Потенциальные побочные эффекты редактирования РНК обратимы, поэтому редактирование РНК более безопасно.

3. По сравнению с предшествующим уровнем техники, указанным способом можно химически синтезировать арРНК и доставлять арРНК пациенту посредством электротрансфекции или липофекции или посредством вектора, такого как аденоассоциированный вирус или лентивирус, причем способы доставки являются гибкими и изменяемыми, а эффективность редактирования выше.

Предпочтительные варианты осуществления настоящей заявки были описаны выше, но настоящая заявка не ограничивается ими. В рамках технической идеи настоящей заявки могут быть выполнены многие простые модификации, включая комбинации различных технических признаков любыми другими подходящими способами, и эти простые модификации и комбинации также должны рассматриваться как содержание, раскрытое в настоящей заявке, и подпадают под объем охраны настоящей заявки.

Технические решения по настоящей заявке будут более подробно описаны ниже со ссылкой на конкретные примеры, но настоящая заявка не ограничивается следующими примерами. Если не указано иное, реагенты, включенные в следующее описание, являются коммерчески доступными продуктами. Некоторые для краткости эксперименты описаны без указания параметров, стадий и применяемых приборов, и следует понимать, что эти эксперименты хорошо известны и воспроизводимы специалистами в данной области техники. Клетки (GM06214), применяемые в настоящем документе, приобретают у Coriell (США), и они представляют собой фибробласты пациентов с синдромом Гурлера. АрРНК, используемую для редактирования, синтезируют с помощью Synthego (США) или Biosyntech

(Сучжоу), секвенирование Сэнгера выполняется с помощью RuiBioTech (Пекин), секвенирование следующего поколения выполняется с помощью Novogene или платформы секвенирования Китайского национального исследовательского института риса.

ПРИМЕРЫ

Пример 1: Обнаружение генотипа мутации клеток GM06214

Клетки GM06214 (фибробласты пациентов с синдромом Гурлера) помещали в раствор для культивирования фибробластов, содержащий 15 % сыворотки (ScienCell, FM, кат. № 2301), добавляли 1 % добавки для роста фибробластов (ScienCell, FGS, кат. № 2301), и клетки культивировали в инкубаторе с 5 % CO₂ при 37 °C в течение 2-3 дней. После роста до 90 % конfluenceности клетки расщепляли 0,25 % панкреатическим ферментом, а затем расщепление прекращали с помощью раствора для культивирования фибробластов, содержащего 15 % сыворотки. ДНК выделяли с помощью набора для выделения ДНК (кат. № DP304-03) от TianGene® (TIANGEN Biotech (Пекин) Co., Ltd.) в соответствии с инструкцией.

Праймеры для восходящей и нисходящей последовательностей сайта мутации в гене IDUA были сконструированы в ресурсе NCBI-Primer blast (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). SEQ ID NO: 1 CGCTTCCAGGTCAACAACAC (прямой праймер hIDUA-F1); SEQ ID NO: 2 CTCGCGTAGATCAGCACCG (обратный праймер hIDUA-R1). Проводят реакцию ПЦР (полимеразная цепная реакция), а затем продукт ПЦР подвергают секвенированию по Сэнгеру. Определили, что генотип мутации клеток представлял собой патогенную мутацию G-в-A на сайте 15704 в геноме IDUA, как показано на фиг. 1.

Пример 2: Скрининг условий электротрансфекции клеток GM06214

После роста до примерно 90 % конfluenceности клетки GM06214 расщепляли, и после прекращения расщепления клетки подсчитывали. Во время электротрансфекции 6 миллионов клеток ресуспендировали 400 мкл предварительно смешанного раствора для электротрансфекции (Lonza, кат. № V4XP-3024), добавляли 20 мкг плазмид GFP (зеленого флуоресцентного белка) (Lonza, кат. № V4XP-3024) и равномерно смешивали с клетками, в качестве образца брали 20 мкл электротрансфекционной системы и детектировали на приборе для ядерной электротрансфекции Lonza в восьми состояниях, включая семь состояний электротрансфекции (см. фиг. 2) и одно состояние отрицательного контроля, и осуществляли двойное определение в каждом состоянии. После электротрансфекции клетки

немедленно переносили в 2 мл раствора для культивирования фибробластов, содержащего 15 % сыворотки (ScienCell, FM, кат. № 2301), клетки каждого состояния инокулировали в 2 лунки 6-луночного планшета, и клетки культивировали в инкубаторе с 5 % CO₂ при 37 °C. Через 24 ч после электротрансфекции клетки из одной лунки из 2 лунок каждого состояния электротрансфекции расщепляли, а долю GFP-положительных клеток обнаруживали с помощью проточного цитометра. Через 48 ч после электротрансфекции клетки из другой лунки из 2 лунок каждого состояния электротрансфекции расщепляли, а долю GFP-положительных клеток определяли с помощью проточного цитометра. Оптимальным условием электротрансфекции клеток было условие электротрансфекции группы CA-137, как показано на фиг. 2.

Пример 3: Ферментативная активность IDUA и эффективность редактирования в клетках GM06214 после электротрансфекции арРНК

Следующие последовательности арРНК были сконструированы и синтезированы для восходящей и нисходящей последовательностей сайтов мутации на пре-мРНК (предшественница мРНК) и зрелой мРНК (зрелая мРНК) после транскрипции гена IDUA: SEQ ID NO: 3 GACGCCACCGUGUGG UUGCUGUCCAGGACGGUCCCGGCCUGCGACACUUCGGCCCAGAGCUGCUCCUCAUCC AGCAGCGCCAGCAGCCCCAUGGCCGUGAGCACCGGCUU (пре-55нт-с-55нт); SEQ ID NO: 4 GACGCCACCGUGUGGUUGCUGUCCAGGACGGUCCCGGCCUGCGACACUUCGGCCC AGAGCUGCUCCUCAUCUGCGGGGCGGGGGGGGGCCGUCGCCGCGUGGGGUCGUUG (м-55нт-с-55нт); и SEQ ID NO: 5 UACCGCUACAGCCACGCUGAUUUCAGCUAUACCUGC CCGGUAUAAAGGGACGUUCACACCGCGAUGUUCUCUGCUGGGGAAUUGCGCGAUAU UCAGGAUUAAGAAGUGC (случайная-111нт). Основание, соответствующее сайту мутации, в синтезированной арРНК было преобразовано из Т в С с образованием неправильного спаривания А-С. Длина синтезированной арРНК предпочтительно составляла 111 нт. Клетки подвергали электротрансфекции в условиях оптимальной электротрансфекции, полученных в Примере 2, и через 48 ч после электротрансфекции клетки собирали и подвергали анализу ферментативной активности и обнаружению эффективности редактирования.

Обнаружение эффективности редактирования:

Сконструированную и синтезированную арРНК растворяли до требуемой концентрации в воде без РНКазы (TransGen, кат. № GI201-01) и хранили при температуре

минус 80 °С. После роста до примерно 90 % конfluenceности клетки GM06214 расщепляли, а после прекращения расщепления клетки подсчитывали. К 1 миллиону клеток добавляли 200 пкмоль арРНК до тех пор, пока объем смеси не составил 100 мкл, клетки подвергали электротрансфекции в условиях CA-137. Через 48 ч после электротрансфекции клетки подсчитывали и подвергали анализу жизнеспособности клеток. Клетки переносили в центрифужную пробирку без фермента РНК и центрифугировали, удаляли супернатант и выделяли РНК с помощью набора для выделения РНК QIAGEN (QIAGEN, кат. № 74134). В соответствии с руководством по эксплуатации, добавляли 5×10^5 клеток и равномерно смешивали с 0,35 мл буфера RLT Plus путем равномерного пипетирования (для криоконсервированных клеток непосредственно выделяется РНК, и рекомендуется промывание один раз с PBS). Лизированный клеточный раствор добавляли к центрифужной колонке с элиминатором гДНК (геномная ДНК) и центрифугировали при 8000 g или выше в течение 30 с, убирали колонку и собирали жидкость. Добавляли 70 % этанол с таким же объемом, что и объем жидкости, и равномерно смешивали с жидкостью путем пипетирования, и осуществляли следующую стадию. Жидкость добавляли в центрифужную колонку RNeasyMinElute и центрифугировали при 8000 g или выше в течение 15 с, и удаляли жидкие отходы. Добавляли 700 мкл буфера RW1 в центрифужную колонку RNeasyMinElute и центрифугировали при 8000 g или выше в течение 15 с, и удаляли жидкие отходы. Добавляли 500 мкл буфера RPE в центрифужную колонку RNeasyMinElute и центрифугировали при 8000 g или выше в течение 15 с, и удаляли жидкие отходы. Добавляли 500 мкл 80 % этанола в центрифужную колонку RNeasyMinElute и центрифугировали при 8000 g или выше в течение 2 мин, и удаляли жидкие отходы. Центрифужную колонку RNeasyMinElute помещали в новую 2 мл колонку для сбора и центрифугировали без покрытия при максимальной относительной центробежной силе в течение 5 мин для высушивания. Центрифужную колонку RNeasyMinElute помещали в новую 1,5 мл колонку для сбора, по каплям добавляли 14 мкл воды без РНКазы в центр мембраны колонки и центрифугировали колонку при максимальной скорости в течение 1 мин для разбавления РНК.

Концентрацию выделенной РНК определяли с помощью Nanodrop (Thermo, кат. № Nanodrop2000), и 1 мкг РНК подвергали обратной транскрипции (Thermo, кат. обратной транскриптазы № 28025013). Система обратной транскрипции была приготовлена в соответствии с таблицей 1, инкубирована при 65 °С в течение 5 мин и немедленно охлаждена в ванне со льдом. Система обратной транскрипции была снова инкубирована при 37 °С в течение 50 мин. Обратную транскриптазу инактивировали при 70 °С в течение 15 мин. ПЦР

проводили в условиях, приведенных в таблице 3. После завершения ПЦР 2 мкл продукта ПЦР подвергали электрофорезу в агарозном геле, а по результатам электрофореза предварительно определяли правильность концентрации продукта ПЦР и размер полосы. После очистки была создана библиотека с продуктами ПЦР, и эти продукты были подвергнуты секвенированию следующего поколения.

Таблица 1. Получение системы обратной транскрипции-1

	Объем (мкл)
Тотальная РНК (1 мкг)	X
Олиго dT	1
10 нМ дНТФ (дезоксинуклеозидтрифосфат)	1
Вода без РНКазы	10-X
Общий объем	12

Реакционная система работала при 65 °С в течение 5 мин, а затем была немедленно перенесена на лед.

Таблица 2. Получение системы обратной транскрипции-2

	Объем (мкл)
Система в таблице 1	12 мкл
5X буфер для синтеза первой цепи	4
0,1 М ДТТ (дитиотреитол)	2
Рекомбинантный ингибитор рибонуклеазы RNaseOUT™	1
M-MLV (вирус мышиноного лейкоза Молони)	1
Общий объем	20

Таблица 3. Условия ПЦР

Стадии	Время	Циклы
98 °С	2 мин	1 цикл
98 °С	15 с	28-35 циклов

63 °C	30 с	
72 °C	15 с	
72 °C	2 мин	1 цикл

Анализ ферментативной активности

Клетки GM06214 расщепляли, центрифугировали, ресуспендировали с 28 мкл 1 × PBS, содержащего 0,1 % Тритон X-100, и лизировали на льду в течение 30 мин. Добавляли 25 мкл лизированного клеточного раствора к 25 мкл субстрата (Cayman, 2A-19543-500, растворенный в 0,4 М растворе формиата натрия, содержащего 0,2 % Тритон X-100, pH равен 3,5), содержащего 190 мкм 4-метилумбеллиферил- α -L-идуронидазы. Клетки инкубировали в темноте при 37 °C в течение 90 мин. Для инактивации реакции катализа добавляли 200 мкл 0,5 М раствора NaOH/глицин (Beijing Chemical Technology, NaOH, кат. № AR500G; Solarbio, Глицин, кат. № G8200) (pH равен 10,3). Клетки центрифугировали при 4 °C в течение 2 мин. Супернатант переносили в 96-луночный планшет и подвергали измерению флуоресценции при длинах волн возбуждения 365 нм и 450 нм с применением прибора Infinite M200 (TECAN).

В настоящей заявке все данные результатов анализа ферментативной активности выражены как кратность активности фермента в клетках GM01323. Клетки GM01323 представляют собой фибробласты пациентов с синдромом Шейе. Синдром Шейе является самым легким подтипом мукополисахаридоза, и он гораздо легче, чем синдром Гурлера. Пациенты с синдромом Шейе обычно имеют лучший прогноз и нормальную продолжительность жизни и могут дожить до взрослого возраста. Активность фермента IDUA в фибробластах пациентов с синдромом Шейе составляет 0,3 % от активности в фибробластах дикого типа здоровых людей.

Как показано на фиг. 3, арРНК, нацеленная на предшественницу мРНК (пре-мРНК), может вызывать высокую ферментативную активность и эффективность редактирования, а арРНК, нацеленная на зрелую мРНК, вызывает значительно низкую ферментативную активность и эффективность редактирования. Следовательно, арРНК, участвующие в следующих примерах, представляют собой арРНК, нацеленные на предшественницу мРНК (пре-мРНК).

Пример 4: Обнаружение эффективности редактирования в сайте-мишени IDUA после электротрансфекции клеточной линии IDUA-репортер арРНК

Как показано на фиг. 4А, плазмиду конструировали путем встраивания

последовательности, несущей сайт мутации IDUA и имеющей примерно 100 п. о. (пар оснований) восходящей и 100 п. о. нисходящей области между последовательностями, экспрессирующими белки mCherry и GFP на лентивирусной плазмиде. Вышеуказанную сконструированную плазмиду получали в виде вируса и применяли для инфицирования клеток 293Т, и после того, как последовательность была интегрирована в геном, проводили скрининг моноклональных клеток IDUA-репортера. Моноклональные клетки могут только экспрессировать белок mCherry из-за влияния терминирующего кодона TAG сайта мутации IDUA во встраиваемой последовательности, после того, как клетки редактируются арРНК, осуществляется TAG- > TGG, белок GFP, расположенный за сайтом мутации, может нормально экспрессироваться, и экспрессия белка GFP может рассматриваться как эффективность редактирования арРНК в клетках. Как показано в таблице 4, предпочтительно конструируют 4 арРНК с различными длинами 51-111 нт, после электротрансфекции клеток арРНК разной длины в условии электротрансфекции по примеру 2, доля GFP в клетках была обнаружена с 1-го по 7-й день, и была предварительно обнаружена эффективность редактирования. Как показано на фиг. 4В, эффективность редактирования последовательности 91нт: 45нт-с-45нт является самой высокой, и пик редактирования появляется на 2 день (48 ч). Это указывает на то, что с точки зрения длины арРНК, не означает, что чем длиннее последовательность, тем выше эффективность редактирования.

Таблица 4

111нт-случайная	SEQ ID NO: 5 uaccgcuacagccacgcugauuuacagcuauaccugcccgguaauaaagggacguucacaccgcgauguu cucugcuggggaauugcgcgauauucaggauuaaagaagugc
91нт-случайная	SEQ ID NO: 6 uaauccugaauaucgcgcaauuccccagcagagaacaucgcggugugaacguccuuuauaccgggca gguaauagcugaauacagcugggc
71нт-случайная	SEQ ID NO: 7 uuacagcuauaccugcccgguaauaaagggacguucacaccgcgauguucucugcuggggaauugcgc gaua
51нт-случайная	SEQ ID NO: 8 uuccccagcagagaacaucgcggugugaacguccuuuauaccgggcaggu
55нт-с-55нт	SEQ ID NO: 4 gacgcccaccgugugguugcuguccaggacggucccggccugcgacacuucggcccagagcugcucc ucaucugcggggcggggggggccgucgccgcgugggucguug

45нт-с-45нт	SEQ ID NO: 9 gugugguugcuguccaggacggucccgccugcgacacuuaggccagagcugcuccucaucugcgg ggcggggggggccgucgccgcu
35нт-с-35нт	SEQ ID NO: 10 uguccaggacggucccgccugcgacacuuaggccagagcugcuccucaucugcggggcggggggg ggcc
25нт-с-25нт	SEQ ID NO: 11 ggucccgccugcgacacuuaggccagagcugcuccucaucugcggggcg

Пример 5: Анализ ферментативной активности IDUA и определение эффективности редактирования РНК в клетках GM06214 в разные моменты времени после электротрансфекции арРНК с разными длинами

Электротрансфекцию клеток GM06214 арРНК с разными длинами (см. таблицу 4) проводили в условиях электротрансфекции по примеру 2, ферментативную активность в клетках анализировали на 2 день, 4 день, 6 день, 8 день, 10 день, 12 день и 14 день, соответственно, после электротрансфекции по способу примера 3, и эффективность редактирования РНК в клетках обнаружили на 2 день и 4 день. Как показано на фиг. 5, ферментативная активность, вызванная последовательностью 91 нт: 45нт-с-45нт, является самой высокой, и ферментативная активность IDUA по-прежнему сохраняется на высоком уровне на 6 день после электротрансфекции. Что касается эффективности редактирования, последовательности 91 нт и 111 нт демонстрируют приблизительно одинаковую эффективность редактирования.

Пример 6: Обнаружение эффективности редактирования нацеливающего основания в различных сайтах на арРНК

В качестве примера была взята арРНК длиной 111 нт, эффективность редактирования нацеливающего основания в разных сайтах на арРНК была обнаружена путем одновременного отсечения с обеих сторон сайта мутации и вырезания из 5'-конца или 3'-конца.

В настоящем примере арРНК вводили в клетки с помощью липофектамина RNAiMAX. Сначала, последовательность арРНК одновременно усекали с обоих концов, а затем один конец фиксировали, а другой конец усекали с получением 14 арРНК и 4 случайных последовательностей одинаковой длины, как показано в таблице 5. Через 48 ч после трансфекции анализировали ферментативную активность IDUA и определяли эффективность редактирования РНК. Как показано на фиг. 6, ферментативная активность

IDUA и эффективность редактирования РНК, вызванные последовательностями 81 нт: 55нт-с-25нт (SEQ ID NO: 14), 71 нт: 55нт-с-15нт (SEQ ID NO: 15), 91 нт: 45нт-с-45нт (SEQ ID NO: 9), 91 нт: 55нт-с-35нт (SEQ ID NO: 13) и 101 нт: 45нт-с-55нт (SEQ ID NO: 17), выше, чем те, что вызваны другими последовательностями.

Таблица 5

111нт-случайная	SEQ ID NO: 5 уaccgcuacagccacgcugauuuacgcuauaccugcccgguaauaaagggacguucacaccgcgauguucucugcugggggaauugcgcggaauuacaggauuaaaagaagugc
91нт-случайная	SEQ ID NO: 6 уаауccугаауауcgcгсааууccccаgсaгaгаасауcгсggуgааcгucccuuуауaccgggсagguауаgсугааасagсгugгс
71нт-случайная	SEQ ID NO: 7 ууусagсuауaccugcccgguaаааagggacguucacaccgcgаугуucucugcuggggаауugсгсгааа
51нт-случайная	SEQ ID NO: 8 ууccccаgсaгaгаасауcгсggуgааcгucccuuуауaccgggсaggu
55нт-с-55нт	SEQ ID NO: 4 gacgcccaccgugugguugcuguccaggacggucccggccugcgacacuucggcccagagcugcucucucaucugcggggcggggggggccgucgccgcguggggucguug
45нт-с-45нт	SEQ ID NO: 9 gugugguugcuguccaggacggucccggccugcgacacuucggcccagagcugcuccucaucugcggggggggggccgucgccgcg
35нт-с-35нт	SEQ ID NO: 10 uguccaggacggucccggccugcgacacuucggcccagagcugcuccucaucugcggggcggggggggggcc
25нт-с-25нт	SEQ ID NO: 11 ggucccggccugcgacacuucggcccagagcugcuccucaucugcggggcg
55нт-с-45нт	SEQ ID NO: 12 gacgcccaccgugugguugcuguccaggacggucccggccugcgacacuucggcccagagcugcucucucaucugcggggcggggggggccgucgccgcg
55нт-с-35нт	SEQ ID NO: 13 gacgcccaccgugugguugcuguccaggacggucccggccugcgacacuucggcccagagcugcuc

	cucaucugcggggcggggggggcc
55нт-с-25нт	SEQ ID NO: 14 gacgcccaccgugugguugcuguccaggacgguccggccugcgacacuucggcccagagcugcuc cucaucugcggggcg
55нт-с-15нт	SEQ ID NO: 15 gacgcccaccgugugguugcuguccaggacgguccggccugcgacacuucggcccagagcugcuc cucau
55нт-с-5нт	SEQ ID NO: 16 gacgcccaccgugugguugcuguccaggacgguccggccugcgacacuucggcccagagc
45нт-с-55нт	SEQ ID NO: 17 gugugguugcuguccaggacgguccggccugcgacacuucggcccagagcugcuccucaucugcg ggggggggggggggccgucgccgcguggggucguug
35нт-с-55нт	SEQ ID NO: 18 uguccaggacgguccggccugcgacacuucggcccagagcugcuccucaucugcggggcgggggg ggggccgucgccgcguggggucguug
25нт-с-55нт	SEQ ID NO: 19 gguccggccugcgacacuucggcccagagcugcuccucaucugcggggcggggggggggccgucgc cgcguggggucguug
15нт-с-55нт	SEQ ID NO: 20 ugcgacacuucggcccagagcugcuccucaucugcggggcggggggggggccgucgccgcgugggg ucguug
5нт-с-55нт	SEQ ID NO: 21 cggcccagagcugcuccucaucugcggggcggggggggggccgucgccgcguggggucguug

Пример 7: Влияние на эффективность редактирования расстояния между нацеливающей базой и 3'-концом

В примере 6 было обнаружено, что ферментативная активность IDUA и эффективность редактирования, вызванные последовательностями 81 нт: 55нт-с-25нт и 71 нт: 55нт-с-15нт, были выше. Чтобы отсеять кратчайшее и оптимальное расстояние между нацеливающей базой и 3'-концом, расстояние между нацеливающей базой и 3'-концом постепенно усекали с 25 нт (81 нт: 55нт-с-25нт) до 10 нт (66 нт: 55нт-с-10нт), как показано в таблице 6. Как показано на фиг. 7А, с помощью анализа ферментативной активности IDUA было обнаружено, что последовательность 24нт-с-11нт имеет оптимальное расстояние между нацеливающим основанием и 3'-концом. Кроме того, для сравнения, видно, что активность

фермента, вызванная последовательностями 80 нт: 55нт-с-24нт (SEQ ID NO: 22), 79 нт: 55нт-с-23нт (SEQ ID NO: 23), 72 нт: 55нт-с-16нт (SEQ ID NO: 30), 70 нт: 55нт-с-14нт (SEQ ID NO: 31) и 67 нт: 55нт-с-11нт (SEQ ID NO: 34), аналогична или выше, чем активность, вызванная SEQ ID NO: 14 и SEQ ID NO: 15.

Кроме того, скрининг оптимального расстояния между нацеливающим основанием и 3'-концом осуществляли на арПНК, нацеленной на сайт мутации IDUA мыши (соответствующей мутации IDUA-W402X человека у человека), расстояние между нацеливающим основанием в арПНК и 3'-концом усекали на каждые 5 оснований с 55 нт, как показано в таблице 7. Как показано на фиг. 7B, с помощью анализа ферментативной активности IDUA было обнаружено, что последовательность 55нт-с-10нт имеет оптимальное расстояние между нацеливающим основанием и 3'-концом. Кроме того, последовательности 111 нт: 55нт-с-50нт (SEQ ID NO: 44) и 66 нт: 55нт-с-10нт (SEQ ID NO: 52) демонстрируют высокую эффективность редактирования.

Таблица 6

55нт-с-25нт	SEQ ID NO: 14 gacgcccaccgugugguugcuguccaggacggucccgccugcgacaciuucggcccagagcugc уссucaucugcggggcg
55нт-с-24нт	SEQ ID NO: 22 gacgcccaccgugugguugcuguccaggacggucccgccugcgacaciuucggcccagagcugc уссucaucugcggggcg
55нт-с-23нт	SEQ ID NO: 23 gacgcccaccgugugguugcuguccaggacggucccgccugcgacaciuucggcccagagcugc уссucaucugcggggg
55нт-с-22нт	SEQ ID NO: 24 gacgcccaccgugugguugcuguccaggacggucccgccugcgacaciuucggcccagagcugc уссucaucugcgggg
55нт-с-21нт	SEQ ID NO: 25 gacgcccaccgugugguugcuguccaggacggucccgccugcgacaciuucggcccagagcugc уссucaucugcggg
55нт-с-20нт	SEQ ID NO: 26 gacgcccaccgugugguugcuguccaggacggucccgccugcgacaciuucggcccagagcugc уссucaucugcg
55нт-с-19нт	SEQ ID NO: 27

		gacgccaccgugugguugcuguccaggacggucccgccugcgacacuucggcccagagcugc uccucaucugc
55HT-c-18HT	SEQ ID NO: 28	gacgccaccgugugguugcuguccaggacggucccgccugcgacacuucggcccagagcugc uccucaucug
55HT-c-17HT	SEQ ID NO: 29	gacgccaccgugugguugcuguccaggacggucccgccugcgacacuucggcccagagcugc uccucaucu
55HT-c-16HT	SEQ ID NO: 30	gacgccaccgugugguugcuguccaggacggucccgccugcgacacuucggcccagagcugc uccucauc
55HT-c-15HT	SEQ ID NO: 15	gacgccaccgugugguugcuguccaggacggucccgccugcgacacuucggcccagagcugc uccucau
55HT-c-14HT	SEQ ID NO: 31	gacgccaccgugugguugcuguccaggacggucccgccugcgacacuucggcccagagcugc uccuca
55HT-c-13HT	SEQ ID NO: 32	gacgccaccgugugguugcuguccaggacggucccgccugcgacacuucggcccagagcugc uccuc
55HT-c-12HT	SEQ ID NO: 33	gacgccaccgugugguugcuguccaggacggucccgccugcgacacuucggcccagagcugc uccu
55HT-c-11HT	SEQ ID NO: 34	gacgccaccgugugguugcuguccaggacggucccgccugcgacacuucggcccagagcugc ucc
55HT-c-10HT	SEQ ID NO: 35	gacgccaccgugugguugcuguccaggacggucccgccugcgacacuucggcccagagcugc uc

Таблица 7

арПНК мышы	55HT-c- 55HT	GacaccacUgUaUgaUUgcUgUccaacacagcccagccUUUgagaccUc UgcccagagUUgUUcUccaUcUaUaagccaagcagagggcUgaggcUgUU ggcUcUcUca (SEQ ID NO: 62)
---------------	-----------------	---

55нт-с- 50нт	GacaccacUgUaUgaUUgcUgUccaacacagccccagccUUUgagaccUc UgcccagagUUgUUCUccaUcUaUaagccaagcagaggggcUgaggcUgUU ggcUc (SEQ ID NO: 44)
55нт-с- 45нт	GacaccacUgUaUgaUUgcUgUccaacacagccccagccUUUgagaccUc UgcccagagUUgUUCUccaUcUaUaagccaagcagaggggcUgaggcUgUU (SEQ ID NO: 45)
55нт-с- 40нт	GacaccacUgUaUgaUUgcUgUccaacacagccccagccUUUgagaccUc UgcccagagUUgUUCUccaUcUaUaagccaagcagaggggcUgagg (SEQ ID NO: 46)
55нт-с- 35нт	gacaccacUgUaUgaUUgcUgUccaacacagccccagccUUUgagaccUc UgcccagagUUgUUCUccaUcUaUaagccaagcagaggggc (SEQ ID NO: 47)
55нт-с- 30нт	gacaccacUgUaUgaUUgcUgUccaacacagccccagccUUUgagaccUc UgcccagagUUgUUCUccaUcUaUaagccaagcag (SEQ ID NO: 48)
55нт-с- 25нт	gacaccacUgUaUgaUUgcUgUccaacacagccccagccUUUgagaccUc UgcccagagUUgUUCUccaUcUaUaagcca (SEQ ID NO: 49)
55нт-с- 20нт	gacaccacUgUaUgaUUgcUgUccaacacagccccagccUUUgagaccUc UgcccagagUUgUUCUccaUcUaUa (SEQ ID NO: 50)
55нт-с- 15нт	gacaccacUgUaUgaUUgcUgUccaacacagccccagccUUUgagaccUc UgcccagagUUgUUCUccaU (SEQ ID NO: 51)
55нт-с- 10нт	gacaccacUgUaUgaUUgcUgUccaacacagccccagccUUUgagaccUc UgcccagagUUgUUC (SEQ ID NO: 52)

Пример 8: Влияние длины 5'-конца на эффективность редактирования

Были выбраны 2 арРНК различной длины, т. е. 76 нт: 55нт-с-20нт и 71 нт: 55нт-с-15нт, длина 3'-конца оставалась неизменной, длина 5'-конца была постепенно усечена, как показано в таблице 8. Как показано на фиг. 8А, с помощью анализа ферментативной активности IDUA было обнаружено, что если длина 5'-конца составляет 55-45 нт, ферментативная активность IDUA в клетках, редактируемых арРНК, является высокой, а если полная длина арРНК составляет 65-61 нт, ферментативная активность IDUA значительно снижается. Длина 3'-конца фиксируется на 14 нт, 5'-конец постепенно отсекается основание за основанием с 51 нт (полная длина составляла 66 нт), и при усечении 5'-конца с 51 нт до 50 нт (полная длина составляла 65 нт) ферментативная активность IDUA значительно снижалась. Следовательно, усечение 5'-конца требует, чтобы полная длина

арРНК составляла не менее 66 нт, как показано на фиг. 8В.

Таблица 8

55нт-с-20нт	SEQ ID NO: 26 gacgccaccgugugguugcuguccaggacggucccgccugcgacacuucggcccagagcugcuccu caucugcg
50нт-с-20нт	SEQ ID NO: 36 ccaccgugugguugcuguccaggacggucccgccugcgacacuucggcccagagcugcuccucauc gcg
45нт-с-20нт	SEQ ID NO: 37 gugugguugcuguccaggacggucccgccugcgacacuucggcccagagcugcuccucaucugcg
40нт-с-20нт	SEQ ID NO: 38 guugcuguccaggacggucccgccugcgacacuucggcccagagcugcuccucaucugcg
35нт-с-20нт	SEQ ID NO: 39 uguccaggacggucccgccugcgacacuucggcccagagcugcuccucaucugcg
55нт-с-15нт	SEQ ID NO: 15 gacgccaccgugugguugcuguccaggacggucccgccugcgacacuucggcccagagcugcuccu cau
50нт-с-15нт	SEQ ID NO: 40 ccaccgugugguugcuguccaggacggucccgccugcgacacuucggcccagagcugcuccucau
45нт-с-15нт	SEQ ID NO: 41 gugugguugcuguccaggacggucccgccugcgacacuucggcccagagcugcuccucau
40нт-с-15нт	SEQ ID NO: 42 guugcuguccaggacggucccgccugcgacacuucggcccagagcugcuccucau
35нт-с-15нт	SEQ ID NO: 43 uguccaggacggucccgccugcgacacuucggcccagagcugcuccucau
51нт-с-14нт	SEQ ID NO: 56 cccaccgugugguugcuguccaggacggucccgccugcgacacuucggcccagagcugcuccuca
50нт-с-14нт	SEQ ID NO: 57 ccaccgugugguugcuguccaggacggucccgccugcgacacuucggcccagagcugcuccuca
49нт-с-14нт	SEQ ID NO: 58

	caccgugugguugcuguccaggacggucccgccugcgacacuuucggcccagagcugcuccuca
48нт-с-14нт	SEQ ID NO: 59 accgugugguugcuguccaggacggucccgccugcgacacuuucggcccagagcugcuccuca
47нт-с-14нт	SEQ ID NO: 60 ccgugugguugcuguccaggacggucccgccugcgacacuuucggcccagagcugcuccuca
46нт-с-14нт	SEQ ID NO: 61 cgugugguugcuguccaggacggucccgccugcgacacuuucggcccagagcugcuccuca

Пример 9: Влияние химических модификаций РНК на эффективность редактирования

Различные химические модификации РНК во время синтеза РНК могут увеличить стабильность РНК и снизить возможность нецелевого воздействия. Общие химические модификации РНК включают 2'-ОМе и модификацию тиофосфата. В настоящем примере были выбраны 2 арРНК разной длины, т. е. 71 нт и 76 нт, и осуществлены различные комбинации двух способов химической модификации, как показано в таблице 8. Конкретные способы модификации были следующими.

СМ1: первые три нуклеотида и последние три нуклеотида в последовательности были, соответственно, подвергнуты модификации 2'-ОМе, причем первые три нуклеотида и последние три нуклеотида были, соответственно, связаны через тиофосфатные связи, и при этом все основания U в последовательностях были подвергнуты модификации 2'-ОМе.

СМ2: первые три нуклеотида и последние три нуклеотида в последовательности были, соответственно, подвергнуты модификации 2'-ОМе, причем первые три нуклеотида и последние три нуклеотида, соответственно, были связаны через тиофосфатные связи, и при этом 3'-ближайшее основание нацеливающего основания представляло собой А, подвергнутое модификации 2'-ОМе.

СМ3: первые три нуклеотида и последние три нуклеотида в последовательности были, соответственно, подвергнуты модификации 2'-ОМе, причем первые три нуклеотида и последние три нуклеотида были, соответственно, связаны через тиофосфатные связи, и при этом 5'-ближайшее основание нацеливающего основания представляло собой С, подвергнутое модификации 2'-ОМе.

СМ4: первые три нуклеотида и последние три нуклеотида в последовательности были, соответственно, подвергнуты модификации 2'-ОМе, причем первые три нуклеотида и последние три нуклеотида были, соответственно, связаны через тиофосфатные связи, и при этом нацеливающее основание было связано с 3'-ближайшим основанием и 5'-ближайшим

основанием нацеливающего основания, соответственно, через тиофосфатные связи.

СМ5: за исключением нацеливающего основания, пяти оснований, примыкающих к нацеливающему основанию, на 5'-конце и пяти оснований, примыкающих к нацеливающему основанию, на 3'-конце, все остальные нуклеотиды были подвергнуты модификации 2'-ОМе, и при этом первые три нуклеотида и последние три нуклеотида были, соответственно, связаны через тиофосфатные связи.

СМ6: первые пять нуклеотидов и последние пять нуклеотидов в последовательности, соответственно, подвергают модификации 2'-ОМе, и первые пять нуклеотидов и последние пять нуклеотидов, соответственно, связываются через тиофосфатные связи.

IDUA в клетках редактировали путем трансфекции клеток GM06214 различными арРНК, клетки собирали через 48 ч после трансфекции и подвергали анализу ферментативной активности IDUA. Как показано на фиг. 9, за исключением способа химической модификации СМ5 (пятая модификация: все нуклеотиды были подвергнуты модификации 2'-ОМе, за исключением 11 нт вблизи нацеливающего основания), активность фермента, вызванная другими способами модификации, является высокой.

Таблица 9

Наименование	Длина	Способ модификации	Последовательность
HIV2-76-СМ1	55нт-с-20нт	СМ1	Gm*Am*Сm*Gro-Cro-Cro-Cro-Aro-Cro-Cro-Gro-Umo-Gro-Umo-Gro-Gro-Umo-Gro-Cro-Umo-Gro-Umo-Gro-Umo-Cro-Cro-Aro-Gro-Gro-Gro-Gro-Gro-Umo-Cro-Cro-Cro-Gro-Gro-Cro-Cro-Umo-Gro-Cro-Gro-Aro-Cro-Aro-Cro-Umo-Umo-Cro-Gro-Cro-Cro-Cro-Aro-Gro-Gro-Gro-Cro-Cro-Umo-Gro-Gro-Cro-Cro-Cro-Cro-Um*Gm*Сm*Gm (SEQ ID NO: 26)
HIV2-76-СМ2	55нт-с-20нт	СМ2	Gm*Am*Сm*Gro-Cro-Cro-Cro-Aro-Cro-Cro-Gro-Umo-Gro-Umo-Gro-Gro-Umo-Gro-Cro-Umo-Gro-Umo-Gro-Umo-Cro-Cro-Aro-Gro-Gro-Gro-Gro-Gro-Umo-Cro-Cro-Cro-Gro-Gro-Cro-Cro-Umo-Gro-Cro-Gro-Aro-Cro-Aro-Cro-Umo-Umo-Cro-Gro-Cro-Cro-Cro-Aro-Gro-Gro-Gro-Cro-Cro-Umo-Gro-Gro-Cro-Cro-Cro-Cro-Um*Gm*Сm*Gm (SEQ ID NO: 26)
HIV2-76-СМ3	55нт-с-20нт	СМ3	Gm*Am*Сm*Gro-Cro-Cro-Cro-Aro-Cro-Cro-Gro-Umo-Gro-Umo-Gro-Gro-Umo-Gro-Cro-Umo-Gro-Umo-Gro-Umo-Cro-Cro-Aro-Gro-Gro-Gro-Gro-Gro-Umo-Cro-Cro-Cro-Gro-Gro-Cro-Cro-Umo-Gro-Cro-Gro-Aro-Cro-Aro-Cro-Umo-Umo-Cro-Gro-Cro-Cro-Cro-Aro-Gro-Gro-Gro-Cro-Cro-Umo-Gro-Gro-Cro-Cro-Cro-Cro-Um*Gm*Сm*Gm (SEQ ID NO: 26)
HIV2-76-СМ4	55нт-с-20нт	СМ4	Gm*Am*Сm*Gro-Cro-Cro-Cro-Aro-Cro-Cro-Gro-Umo-Gro-Umo-Gro-Gro-Umo-Gro-Cro-Umo-Gro-Umo-Gro-Umo-Cro-Cro-Aro-Gro-Gro-Gro-Gro-Gro-

			Umo-Cro-Cro-Cro-Gro-Gro-Cro-Cro-Umo-Gro-Cro-Gro-Aro-Cro-Aro-Cro-Umo-Umo-Cro-Gro-Cro-Cro-Cro-Aro-Gro-Gro-Gro-Cro-Cro-Umo-Gro-Gro-Cro-Cro-Cro-Cro-Um*Gm*Cm*Gm (SEQ ID NO: 26)
HIV2-76-CM5	55HT-c-20HT	CM5	Gm*Am*Cm*Gmo-Cmo-Cmo-Cmo-Amo-Cmo-Cmo-Gmo-Umo-Gmo-Umo-Gmo-Gmo-Umo-Umo-Gmo-Cmo-Umo-Gmo-Umo-Cmo-Cmo-Amo-Gmo-Gmo-Amo-Cmo-Gmo-Gmo-Umo-Cmo-Cmo-Cmo-Gmo-Gmo-Cmo-Cmo-Umo-Gmo-Cmo-Gmo-Amo-Cmo-Amo-Cmo-Umo-Umo-Cro-Gro-Gro-Cro-Cro-Cro-Aro-Gro-Aro-Gro-Cro-Umo-Gmo-Cmo-Umo-Cmo-Cmo-Umo-Cmo-Amo-Umo-Cmo-Um*Gm*Cm*Gm (SEQ ID NO: 26)
HIV2-76-CM6	55HT-c-20HT	CM6	Gm*Am*Cm*Gm*Cm*Cro-Cro-Aro-Cro-Cro-Gro-Uro-Gro-Uro-Gro-Gro-Uro-Uro-Gro-Cro-Uro-Gro-Uro-Cro-Cro-Aro-Gro-Gro-Aro-Cro-Gro-Gro-Uro-Cro-Cro-Cro-Gro-Gro-Cro-Cro-Uro-Gro-Cro-Gro-Aro-Cro-Aro-Cro-Uro-Uro-Cro-Gro-Gro-Cro-Cro-Cro-Aro-Gro-Aro-Gro-Cro-Uro-Gro-Cro-Uro-Cro-Cro-Uro-Cro-Aro-Ur*Cm*Um*Gm*Cm*Gm (SEQ ID NO: 26)
HIV2-71-CM1	55HT-c-15HT	CM1	Gm*Am*Cm*Gro-Cro-Cro-Cro-Aro-Cro-Cro-Gro-Umo-Gro-Umo-Gro-Gro-Umo-Umo-Gro-Cro-Umo-Gro-Umo-Cro-Cro-Aro-Gro-Gro-Aro-Cro-Gro-Gro-Umo-Cro-Cro-Cro-Gro-Gro-Cro-Cro-Umo-Gro-Cro-Gro-Aro-Cro-Aro-Cro-Umo-Umo-Cro-Gro-Gro-Cro-Cro-Cro-Aro-Gro-Aro-Gro-Cro-Umo-Gro-Cro-Umo-Cro-Cro-Um*Cm*Am*Um (SEQ ID NO: 15)
HIV2-71-CM2	55HT-c-15HT	CM2	Gm*Am*Cm*Gro-Cro-Cro-Cro-Aro-Cro-Cro-Gro-Umo-Gro-Umo-Gro-Gro-Umo-Umo-Gro-Cro-Umo-Gro-Umo-Cro-Cro-Aro-Gro-Gro-Aro-Cro-Gro-Gro-Umo-Cro-Cro-Cro-Gro-Gro-Cro-Cro-Umo-Gro-Cro-Gro-Aro-Cro-Aro-Cro-Umo-Umo-Cro-Gro-Gro-Cro-Cro-Cro-Amo-Gro-Aro-Gro-Cro-Umo-Gro-Cro-Umo-Cro-Cro-Um*Cm*Am*Um
HIV2-71-CM3	55HT-c-15HT	CM3	Gm*Am*Cm*Gro-Cro-Cro-Cro-Aro-Cro-Cro-Gro-Umo-Gro-Umo-Gro-Gro-Umo-Umo-Gro-Cro-Umo-Gro-Umo-Cro-Cro-Aro-Gro-Gro-Aro-Cro-Gro-Gro-Umo-Cro-Cro-Cro-Gro-Gro-Cro-Cro-Umo-Gro-Cro-Gro-Aro-Cro-Aro-Cro-Umo-Umo-Cro-Gro-Gro-Cro-Cmo-Cro-Aro-Gro-Aro-Gro-Cro-Umo-Gro-Cro-Umo-Cro-Cro-Um*Cm*Am*Um (SEQ ID NO: 15)
HIV2-71-CM4	55HT-c-15HT	CM4	Gm*Am*Cm*Gro-Cro-Cro-Cro-Aro-Cro-Cro-Gro-Umo-Gro-Umo-Gro-Gro-Umo-Umo-Gro-Cro-Umo-Gro-Umo-Cro-Cro-Aro-Gro-Gro-Aro-Cro-Gro-Gro-Umo-Cro-Cro-Cro-Gro-Gro-Cro-Cro-Umo-Gro-Cro-Gro-Aro-Cro-Aro-Cro-Umo-Umo-Cro-Gro-Gro-Cro-Cr*Cr*Ar-Gro-Aro-Gro-Cro-Umo-Gro-Cro-Umo-Cro-Cro-Um*Cm*Am*Um (SEQ ID NO: 15)
HIV2-71-CM5	55HT-c-15HT	CM5	Gm*Am*Cm*Gmo-Cmo-Cmo-Cmo-Amo-Cmo-Cmo-Gmo-Umo-Gmo-Umo-Gmo-Gmo-Umo-Umo-Gmo-

			Cmo-Umo-Gmo-Umo-Cmo-Cmo-Amo-Gmo-Gmo-Amo-Cmo-Gmo-Gmo-Umo-Cmo-Cmo-Cmo-Gmo-Gmo-Cmo-Cmo-Umo-Gmo-Cmo-Gmo-Amo-Cmo-Amo-Cmo-Umo-Umo-Cro-Gro-Gro-Cro-Cro-Cro-Aro-Gro-Aro-Gro-Cro-Umo-Gmo-Cmo-Umo-Cmo-Cmo-Um* <i>Cm</i> *Am*Um (SEQ ID NO: 15)
HIV2-71- CM6	55нт-с- 15нт	CM6	Gm*Am* <i>Cm</i> *Gm* <i>Cm</i> *Cro-Cro-Aro-Cro-Cro-Gro-Uro-Gro-Uro-Gro-Gro-Uro-Uro-Gro-Cro-Uro-Gro-Uro-Cro-Cro-Aro-Gro-Gro-Aro-Cro-Gro-Gro-Uro-Cro-Cro-Cro-Gro-Gro-Cro-Cro-Uro-Gro-Cro-Gro-Aro-Cro-Aro-Cro-Uro-Uro-Cro-Gro-Gro-Cro-Cro-Cro-Aro-Gro-Aro-Gro-Cro-Uro-Gro-Cro-Uro-Cro* <i>Cm</i> *Um* <i>Cm</i> *Am*Um (SEQ ID NO: 15)

Примечание: го обозначает, что нуклеотиды не модифицированы, и сложноэфирные связи между нуклеотидами не модифицированы; г* обозначает, что нуклеотиды не модифицированы, и нуклеотиды связаны через тиофосфатные связи; то обозначает, что нуклеотиды подвергаются модификации 2'-ОМе, а сложноэфирные связи между нуклеотидами не модифицированы; и m* обозначает, что нуклеотиды подвергаются модификации 2'-ОМе, и нуклеотиды связаны через тиофосфатные связи.

Пример 10: Влияние химических модификаций на эффективность редактирования

В настоящем примере применяли три предпочтительные арПНК, нацеленные на сайт мутации IDUA человека, и одну предпочтительную арПНК, нацеленную на сайт мутации IDUA мыши, и химически модифицировали способом CM1. Эксперименты с градиентом концентрации проводили на клетках GM06214 и клетках MEF MSPI (эмбриональные фибробласты мыши (MEF) MSPI), выделенных из эмбриона мыши (W392X мыши IDUA, B6.129S- Iduatm^{1.1 Kmke}/J) с гомозиготной мутацией IDUA (Wang D, Shukla C, Liu X, et al. Characterization of an MPS I-H knock-in mouse that carries a nonsense mutation analogous to the human IDUA-W402X mutation [опубликованное исправление появилось в Mol Genet Metab. 2010 Apr;99(4):439]. Mol Genet Metab. 2010;99(1):62-71. doi:10.1016/j.ymgme.2009.08.002).

На основании результатов экспериментов примера 7, были выбраны три арПНК, нацеленные на IDUA человека, т. е. последовательности 55нт-с-16нт, 55нт-с-14нт и 55нт-с-11нт, и одна арПНК, нацеленная на IDUA мыши, т. е. последовательность 55нт-с-10нт. Кроме того, в качестве контроля была выбрана случайная последовательность арПНК RM-67CM1. На основании результатов экспериментов примера 9, были синтезированы вышеуказанные арПНК, нацеленные на IDUA, с помощью способа химической модификации CM1 (все основания U были подвергнуты модификации 2'-ОМе), как показано в таблице 9. Проводили сравнительные эксперименты по трансфекции клеток GM06214 человека и MEF MSPI мыши

арРНК в различных концентрациях. Были установлены девять концентраций арРНК: 160 нМ, 80 нМ, 40 нМ, 20 нМ, 10 нМ, 5 нМ, 2,5 нМ, 1,25 нМ и 0,625 нМ. Клетки наносили на 6-луночный планшет, трансфицировали через 24 ч после нанесения и расщепляли через 48 ч после трансфекции, половину клеток брали для анализа ферментативной активности IDUA, а половину клеток брали для выделения РНК и обнаружения эффективности редактирования. Как показано на фиг. 10А и фиг. 10С, если концентрация трансфекции арРНК равна или выше 2,5-5 нМ, может быть достигнута высокая ферментативная активность, а если концентрация трансфекции равна или выше 10-20 нМ, ферментативная активность достигает плато. Как показано на фиг. 10В и фиг. 10D, при условии одинаковой концентрации трансфекции арРНК, ферментативная активность IDUA и эффективность редактирования в клетках человека (GM06214) отличаются от таковых в клетках мыши (MEF MSPI).

Таблица 10

Наименование и длина	Способ модификации	Последовательность
55нт-с-11нт CM1	CM1	`-Gm*Am*Cm*Gro-Cro-Cro-Cro-Aro-Cro-Cro-Gro-Umo-Gro-Umo-Gro-Gro-Umo-Umo-Gro-Cro-Umo-Gro-Umo-Cro-Cro-Aro-Gro-Gro-Aro-Cro-Gro-Gro-Umo-Cro-Cro-Cro-Gro-Gro-Cro-Cro-Umo-Gro-Cro-Gro-Aro-Cro-Aro-Cro-Umo-Umo-Cro-Gro-Gro-Cro-Cro-Cro-Aro-Gro-Aro-Gro-Cro-Umo-Gro-Cr*Um*Cm*Cm (SEQ ID NO: 34)
55нт-с-16нт CM1	CM1	`-Gm*Am*Cm*Gro-Cro-Cro-Cro-Aro-Cro-Cro-Gro-Umo-Gro-Umo-Gro-Gro-Umo-Umo-Gro-Cro-Umo-Gro-Umo-Cro-Cro-Aro-Gro-Gro-Aro-Cro-Gro-Gro-Umo-Cro-Cro-Cro-Gro-Gro-Cro-Cro-Umo-Gro-Cro-Gro-Aro-Cro-Aro-Cro-Umo-Umo-Cro-Gro-Gro-Cro-Cro-Cro-Aro-Gro-Aro-Gro-Cro-Umo-Gro-Cro-Umo-Cro-Cr*Um*Cm*Am (SEQ ID NO: 30)
55нт-с-14нт CM1	CM1	`-Gm*Am*Cm*Gro-Cro-Cro-Cro-Aro-Cro-Cro-Gro-Umo-Gro-Umo-Gro-Gro-Umo-Umo-Gro-Cro-Umo-Gro-Umo-Cro-Cro-Aro-Gro-Gro-Aro-Cro-Gro-Gro-Umo-Cro-Cro-Cro-Gro-Gro-Cro-Cro-Umo-Gro-Cro-Gro-Aro-Cro-Aro-Cro-Umo-Umo-Cro-Gro-Gro-Cro-Cro-Cro-Aro-Gro-Aro-Gro-Cro-Umo-Gro-Cro-Umo-Cro-Cro-Umo-

		Cr*Am*Um*Cm (SEQ ID NO: 31)
Случайная PHK-67нт CM1	CM1	`-Um*Am*Cm*Cro-Gro-Cro-Umo-Aro-Cro-Aro-Gro-Cro-Cro-Aro-Cro-Gro-Cro-Umo-Gro-Aro-Umo-Umo-Umo-Cro-Aro-Gro-Cro-Umo-Aro-Umo-Aro-Cro-Cro-Umo-Gro-Cro-Cro-Cro-Gro-Gro-Umo-Aro-Umo-Aro-Aro-Aro-Gro-Gro-Gro-Aro-Cro-Gro-Umo-Umo-Cro-Aro-Cro-Aro-Cro-Cro-Gro-Cro-Gr*Am*Um*Gm (SEQ ID NO: 53)
55нт-с-10нт CM1 мыши	CM1	Gm*Am*Cm*Aro-Cro-Cro-Cro-Aro-Cro-Umo-Gro-Umo-Aro-Umo-Gro-Aro-Umo-Umo-Gro-Cro-Umo-Gro-Umo-Cro-Cro-Aro-Aro-Cro-Aro-Cro-Aro-Gro-Cro-Cro-Cro-Cro-Aro-Gro-Cro-Cro-Umo-Umo-Umo-Gro-Aro-Gro-Aro-Cro-Cro-Umo-Cro-Umo-Gro-Cro-Cro-Cro-Aro-Gro-Aro-Gro-Umo-Umo-Gr*Um*Um*Um (SEQ ID NO: 52)

Примечание: го обозначает, что нуклеотиды не модифицированы, и сложноэфирные связи между нуклеотидами не модифицированы; r* обозначает, что нуклеотиды не модифицированы, и нуклеотиды связаны через тиофосфатные связи; то обозначает, что нуклеотиды подвергаются модификации 2'-ОМе, а сложноэфирные связи между нуклеотидами не модифицированы; и m* обозначает, что нуклеотиды подвергаются модификации 2'-ОМе, и нуклеотиды связаны через тиофосфатные связи.

Пример 11: Устойчивая протеазная активность IDUA после редактирования с помощью арPHK

В настоящем примере применяли три предпочтительные арPHK, нацеленные на сайт мутации IDUA человека, и одну предпочтительную арPHK, нацеленную на сайт мутации IDUA мыши, и химически модифицировали способом CM1. Ферментативная активность IDUA в клетках GM06214 и клетках MEF MSPI (эмбриональных фибробластов мыши) была значительно улучшена, что продолжалось около 3 недель.

В примере 10 через 48 ч после трансфекции клеток человека и мыши предпочтительными арPHK, нацеленными на IDUA, в различных концентрациях, сравнивали ферментативные активности IDUA. В настоящем примере применяли арPHK в концентрации 20 нМ, сравнивали ферментативную активность IDUA и эффективность редактирования в разные моменты времени. После трансфекции клеток GM06214 арPHK ферментативную

активность IDUA непрерывно анализировали в течение 14 дней. Как показано на фиг. 11A, пик ферментативной активности IDUA появляется на 4-й и 9-й день после трансфекции, активность фермента IDUA на 14-й день все еще выше, чем на 2-й день. Затем активность фермента IDUA анализировали на 17-й день и 21-й день после трансфекции. Как показано на фиг. 10A, активность фермента на 21-й день все еще выше, чем на 1-й день после трансфекции, и активность фермента примерно в 6-10 раз выше, чем в GM01323. (Должна быть добавлена эффективность редактирования, см. фиг. 11B). После трансфекции клеток MEF MSPI арРНК активность фермента IDUA непрерывно анализировали в течение 8 дней. Как показано на фиг. 11C, с 24 ч до 8 дня после трансфекции арРНК активность фермента примерно в 2 раза выше, чем в клетках GM1323. Как показано на фиг. 11D, пик эффективности редактирования IDUA появляется через 24 ч после трансфекции, а затем эффективность редактирования IDUA непрерывно снижается.

При сравнении данных клеток человека и мыши установлено, что пик эффективности редактирования арРНК в клетках мыши появляется через 24 ч после трансфекции, в то время как пик эффективности редактирования арРНК в клетках человека появляется через 48 ч после трансфекции. После редактирования активность фермента IDUA в клетках человека длится более 21 дня, тогда как активность фермента IDUA в клетках мыши продолжается более 8 дней.

Пример 12: Влияние способов доставки арРНК на эффективность редактирования

В настоящем примере сайты дикого типа на гене PPIB в клетках печени человека и мыши, полученные с помощью первичной клеточной культуры, редактировали с помощью LEAPER, а арРНК для скрининга оптимального способа доставки доставляли различными способами.

«PPIB» относится к сайту дикого типа в UTR-области (нетранслируемой области) NM_000942 (PPIB геномная chr15 (-): 64163082) человека или сайту дикого типа в UTR-области NM_011149 (PPIB геномная chr9 (+): 66066490) мыши. PPIB может представлять собой зрелую мРНК или предшественница мРНК. UTR-область PPIB содержит одну TAG. В настоящем примере А в TAG, служащей в качестве мишени, редактировали для обнаружения эффективности редактирования арРНК по настоящей заявке в клетках печени.

арРНК (55нт-с-15нт), нацеленная на UTR-область PPIB, была сконструирована и синтезирована, как показано в таблице 11. Часть синтезированной арРНК растворяли, расфасовывали, хранили при минус 80 °С и применяли для трансфекции клеток с помощью Lipro (липофектамина RNAiMAX), а остальную часть арРНК получали в LNP. LNP были

получены на основе публикации Witzigmann D, Kulkarni J A, Leung J, et al. Lipid nanoparticle technology for therapeutic gene regulation in the liver[J]. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2020.; Kauffman K J, Dorkin J R, Yang J H, et al. Optimization of lipid nanoparticle formulations for mRNA delivery in vivo with fractional factorial and definitive screening designs[J]. *Nano letters*, 2015, 15(11): 7300-7306.; и Reis J, Kanagaraj S, Fonseca A, et al. In vitro studies of multiwalled carbon nanotube/ultrahigh molecular weight polyethylene nanocomposites with osteoblast-like MG63 cells[J]. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 2010, 43(5): 476-482.

Первичные клетки печени человека приобретали у LONZA (кат. № HUCPI) и восстанавливали и культивировали в соответствии с руководством по эксплуатации (среда для восстановления, кат. №: MCHT50, среда для планкинга, кат. №: MP100). После прилипания клеток к стенкам среду заменяли средой для поддержания гепатоцитов 5C (ссылаясь на Xiang C, Du Y, Meng G, et al. Long-term functional maintenance of primary human hepatocytes in vitro[J]. *Science*, 2019, 364(6438): 399-402).

Первичные клетки печени мыши отделяли от C57BJ мыши (ссылаясь на Charni-Natan M, Goldstein I. Protocol for Primary Mouse Hepatocyte Isolation[J]. *STAR protocols*, 2020, 1(2): 100086.), и после прилипания отделенных клеток печени к стенкам среду заменяли поддерживающей средой 5C.

Через 24 ч после восстановления клеток печени человека, доставляли арРНК, и обе концентрации арРНК, доставляемой с помощью LNP и Lipo, составляли 20 нМ. Через 24 ч после сепарации культуры клеток печени мыши, доставляли арРНК, и обе концентрации арРНК, доставляемой с помощью LNP и Lipo, составляли 20 нМ. РНК клеток печени человека выделяли через 24 ч после доставки арРНК, РНК клеток печени мыши выделяли через 48 ч после доставки арРНК, и эффективность редактирования определяли с помощью секвенирования следующего поколения. Как показано на фиг. 12А, в клетках печени человека через 48 ч после доставки арРНК с помощью двух способов эффективность редактирования выше, чем через 24 ч после доставки арРНК, а между тем, через 24 ч после доставки арРНК эффективность редактирования, вызванная доставкой LNP, выше, чем эффективность редактирования, вызванная доставкой Lipo, и через 48 ч после доставки, эффективность редактирования, вызванная двумя способами доставки, приблизительно одинакова. Как показано на фиг. 12В, в клетках печени мыши через 24 ч после доставки арРНК двумя способами эффективность редактирования выше, чем через 48 ч после доставки арРНК, а между тем, через 24 ч и 48 ч после доставки арРНК, эффективность редактирования, вызванная доставкой Lipo, выше, чем эффективность редактирования, вызванная доставкой LNP.

Таким образом, путем сравнения эффективности редактирования на сайте PPIV в первичных клетках печени, определено, что пик редактирования в клетках печени мыши появляется через 24 ч после доставки арПНК, а пик редактирования в клетках печени человека появляется через 48 ч после доставки арПНК, и эти данные совпадают с данными клеток GM06214 человека и клеток MEF MSPI мыши. Для доставки арПНК в клетки печени человека способ доставки LNP лучше, чем Lipo, или равноценен ему. Для доставки арПНК в клетки печени мыши способ доставки Lipo намного лучше, чем LNP.

Таблица 11

55нт-с-15нт мышь	CACCCCAUCAGAUGGAAGCACUAGGGCCAGGGUGGCACAGAAC CUUGUGACUGGCCACCUUCGUCUGUGUG (SEQ ID NO: 54)
55нт-с-15нт человека	GGAGGCGAAAGCAGCCCGGACAGCUGAGGCCGGAAGAGGGUG GGGCCGCGGUGGCCAGGGAGCCGGCGCCG (SEQ ID NO: 55)

Пример 13: Эффективность редактирования, вызванная доставкой LNP

Настоящий пример включает исследование эффективности редактирования арПНК в IDUA после доставки арПНК в клетки печени человека и мыши, полученные с помощью первичной клеточной культуры, через LNP.

В настоящем примере была сконструирована и синтезирована арПНК, нацеленная на сайт дикого типа в области CDS (кодирующая область) IDUA человека, как показано в таблице 12. АрПНК (20 нМ), нацеленные на IDUA человека и мыши, были, соответственно, доставлены в первичные клетки печени человека и первичные клетки печени мыши с помощью LNP, и через 24 ч и 48 ч после доставки, была обнаружена эффективность редактирования. Как показано на фиг. 13, в клетках печени, полученных с помощью первичной клеточной культуры *in vitro*, эффективность редактирования арПНК в IDUA человека достигает пика в примерно 30 % через 48 ч после доставки, а эффективность редактирования арПНК в IDUA мыши достигает пика в примерно 15 % через 24 ч после доставки. Это дополнительно указывает на то, что LNP может обеспечить более высокую эффективность доставки в клетках человека, особенно первичных клетках печени человека.

Таблица 12

55нт-с-15нт IDUA	GGAGGCGAAAGCAGCCCGGACAGCUGAGGCCGGAAGAGGGUGGG GCCGCGGUGGCCAGGGAGCCGGCGCCG (SEQ ID NO: 55)
---------------------	---

человека	
----------	--

Пример 14: Лечебный эффект арПНК на IDUA в мышинной модели MSPI

В настоящем примере использовали мышиную модель МПС I (W392X IDUA мыши, B6.129S-Iduatm^{1.1Kmkc}/J) (Wang D, Shukla C, Liu X, et al. Characterization of an MPS I-H knock-in mouse that carries a nonsense mutation analogous to the human IDUA-W402X mutation [опубликованное исправление появилось в Mol Genet Metab. 2010 Apr;99(4):439]. Mol Genet Metab. 2010;99(1): 62-71. Doi:10.1016/j.ymgme.2009.08.002). Мутация соответствует мутации IDUA-W402X человека, которая может преждевременно прекратить синтез белков, и она преобладает у пациентов с мукополисахаридозом Гурлера (МПС I-H). Такая болезнь лизосомального накопления вызвана дефицитом α -L-идуронидазы. Активность α -L-идуронидазы не обнаружена в тканях головного мозга и печени 5-, 10- и 30-недельных гомозиготных мышей. Хотя эти гомозиготные мыши с мутациями жизнеспособны и фертильны, их средняя продолжительность жизни составляла 69 недель. Гомозиготы демонстрировали прогрессирующее увеличение экскреции гликозаминогликанов (ГАГ) в моче и прогрессирующее накопление ГАГ в тканях. Устойчивый уровень мРНК IDUA снижали на 30-50 %. Гистологический анализ показал прогрессирующее накопление лизосомных включений в цитоплазме клеток Пуркинье и мозговых нейронов, а также увеличение инфильтрации пенных макрофагов с возрастом. Рентгенограммы показали видимое утолщение челюстной дуги и бедренной кости у 15-недельной мыши и значительное утолщение у 35-недельной мыши. В возрасте 35 недель минеральная плотность бедренной кости увеличилась, а процент жира в теле уменьшился. Выбранную арПНК, нацеленную на мутацию IDUA мыши, т. е. 55нт-с-10нт CM1 (SEQ ID NO: 52), получали в LNP. АрПНК в различных концентрациях вводили через хвостовую вену, и различные концентрации составляли 0,1 мг/кг, 0,5 мг/кг, 2 мг/кг и 10 мг/кг, соответственно. Через 24 ч после введения отбирали клетки печени мыши для обнаружения эффективности редактирования в IDUA. Как показано на фиг. 14, через 24 ч после введения, эффективность редактирования у мыши, которой вводили арПНК в концентрации 10 мг/кг, составляет примерно 2 %. Результаты настоящего примера доказывают, что арПНК, нацеленная на IDUA в мышинной модели MSPI, может обеспечить точное редактирование гена мутации IDUA в клетках печени *in vivo* и корректировать мутацию IDUA для достижения цели лечения МПС I.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ целевого редактирования РНК-мишени в клетке-мишени на основе LEAPER (Leveraging endogenous ADAR (Adenosine Deaminase Acting on RNA) for programmable editing of RNA - применение эндогенной ADAR (аденозиндезаминазы, действующей на РНК) для программируемого редактирования РНК), где РНК-мишень представляет собой РНК, содержащую мутацию G-в-A в транскрипте гена IDUA (Alpha-L-Iduronidase - альфа-L-идуронидазы), и способ включает:

доставку конструкции, содержащей рекрутирующую аденозиндезаминазу РНК (арРНК), для редактирования РНК-мишени или конструкции для кодирования арРНК в клетку-мишень, причем арРНК содержит комплементарную последовательность РНК, которая гибридизуется с РНК-мишенью и способна рекрутировать аденозиндезаминазу, действующую на РНК (ADAR), для дезаминирования целевого аденозина (А) в РНК-мишени.

2. Способ по п. 1, где арРНК содержит основание С (цитозин), А (аденин), U (урацил) или G (гуанин), которое спарено с целевым А.

3. Способ по п. 1 или 2, где длина арРНК составляет примерно 151-61 нт (нуклеотид), 131-66 нт, 121-66 нт, 111-66 нт, 91-66 нт или 81-66 нт.

4. Способ по п. 3, где расстояние между нацеливающим основанием в арРНК и 3'-концом составляет 45-5 нт, 40-5 нт, 35-10 нт, 25-15 нт или 24-11 нт.

5. Способ по п. 3 или 4, где расстояние между нацеливающим основанием и 5'-концом в арРНК составляет 80-30 нт, 70-35 нт, 60-40 нт, 55-35 нт или 55-45 нт.

6. Способ по любому из пп. 1-5, где клетка-мишень представляет собой клетку человека.

7. Способ по любому из пп. 1-6, где РНК-мишень представляет собой РНК, содержащую сайт мутации NM_000203.4(IDUA)-c.1205G-A(p.Trp402Ter).

8. Способ по любому из пп. 1-7, где арРНК содержит любую из следующих последовательностей: SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31 и SEQ ID NO: 34.

9. Способ по любому из пп. 1-5, где арРНК содержит любую из следующих последовательностей: SEQ ID NO: 44 и SEQ ID NO: 52.

10. Способ по любому из пп. 1-9, где арРНК является химически модифицированной.

11. Способ по п. 10, где указанная химическая модификация включает 2-O'-

метилование (2'-ОМе) или модификацию тиофосфата.

12. Способ по п. 11, где указанная химическая модификация представляет собой одну или более модификаций, выбранных из группы, состоящей из:

модификации 2'-ОМе на каждом из первых трех нуклеотидов и последних трех нуклеотидов в последовательности арРНК;

тиофосфатной связи между нуклеотидами первых трех нуклеотидов и последних трех нуклеотидов;

модификации 2'-ОМе на всех основаниях U в последовательности арРНК;

модификации 2'-ОМе на основании A, которое является 3'-основанием, ближайшим к нацеливаемому основанию;

модификации 2'-ОМе на основании C, которое является 5'-основанием, ближайшим к нацеливаемому основанию;

тиофосфатной связи между нацеливающим основанием и его 3'-ближайшим основанием и 5'-ближайшим основанием, соответственно;

модификации 2'-ОМе на каждом из первых пяти нуклеотидов и последних пяти нуклеотидов; и

тиофосфатной связи между нуклеотидами первых пяти нуклеотидов и последних пяти нуклеотидов.

13. Способ по любому из пп. 1-9, где конструкция для кодирования арРНК представляет собой линейную цепь нуклеиновой кислоты, вирусный вектор или плазмиду.

14. Способ по п. 13, где вирусный вектор представляет собой вектор аденоассоциированного вируса (AAV) или вектор экспрессии лентивируса.

15. Способ по любому из пп. 1-14, где способ доставки представляет собой электротрансфекцию, липофекцию или доставку или инфицирование липидной наночастицей (LNP - lipid nanoparticle).

16. Способ по п. 15, где конструкция, содержащая рекрутирующую аденозиндезаминазу РНК, для редактирования РНК-мишени или конструкция для кодирования арРНК доставляется в клетку-мишень через LNP.

17. Способ по любому из пп. 1-16, где концентрация доставки арРНК равна или выше 2,5 нМ, 5 нМ, 10 нМ, 15 нМ или 20 нМ.

18. АрРНК для целевого редактирования РНК-мишени в клетке-мишени на основе LEAPER или кодирующая последовательность арРНК, где арРНК содержит или состоит из любой из следующих последовательностей: SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 44 и SEQ ID NO: 52.

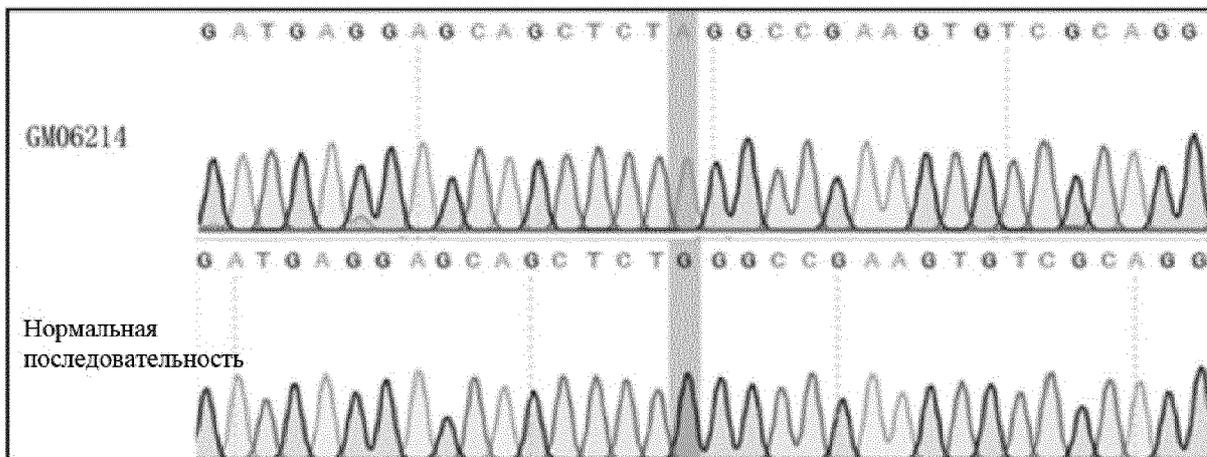
19. Плазмида, вирусный вектор, липосома или липидная наночастица, содержащая арРНК или кодирующую последовательность арРНК по п. 18.

20. Композиция или биологический продукт, содержащая арРНК или кодирующую последовательность арРНК по п. 18, или содержащая плазмиду, вирусный вектор, липосому или липидную наночастицу по п. 19.

21. Способ лечения МПС II (мукополисахаридоза I типа, синдром Гурлера) у индивидуума, включающий коррекцию мутации G-в-A, связанной с МПС II, в клетке-мишени индивидуума способом по любому из пп. 1-17.

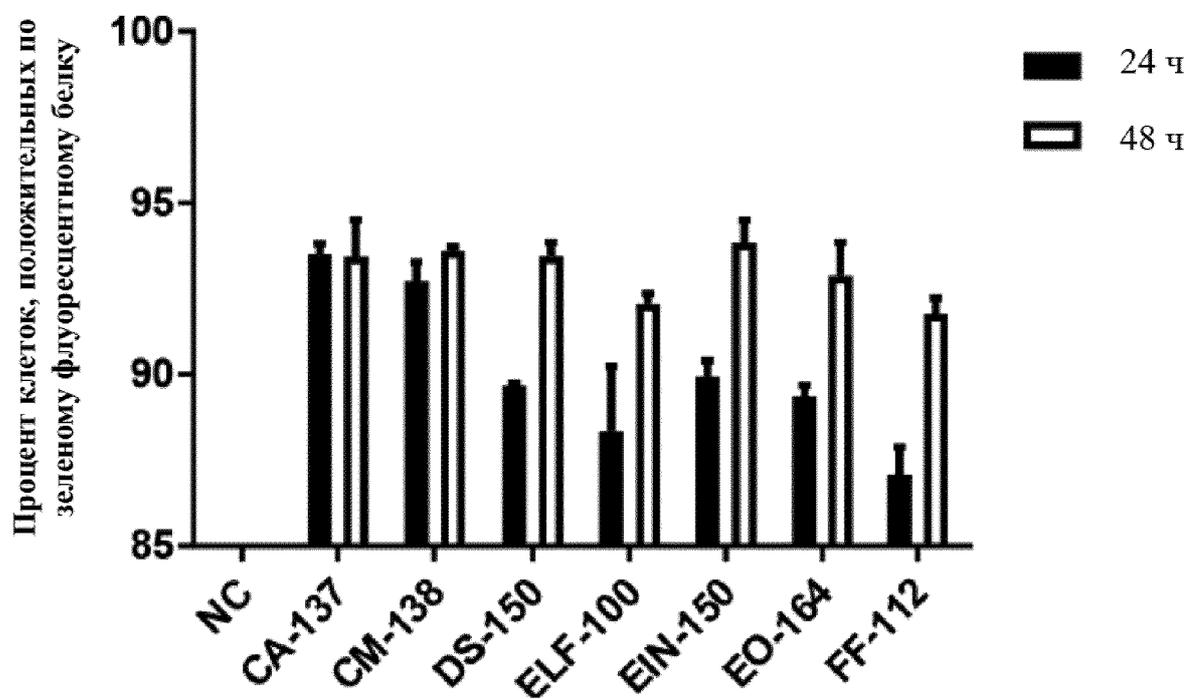
22. Способ по п. 20, где мутация представляет собой мутацию NM_000203.4(IDUA)-c.1205G-A(p.Trp402Ter).

23. Способ по п. 20 или 21, где арРНК вводят с частотой каждые 21 день или чаще, каждые 17 дней или чаще, каждые 14 дней или чаще или каждые 10 дней или чаще.

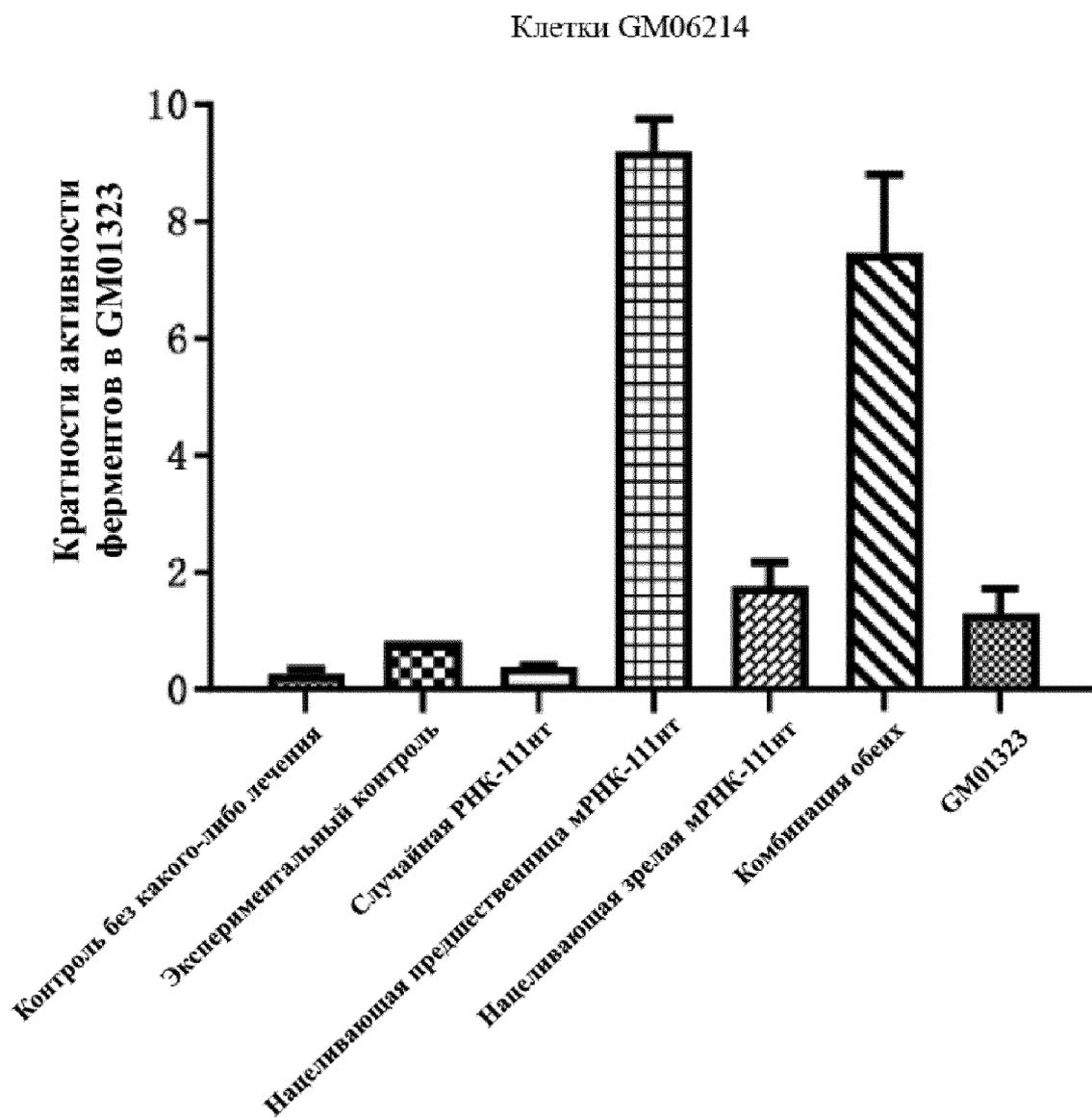


Фигура 1

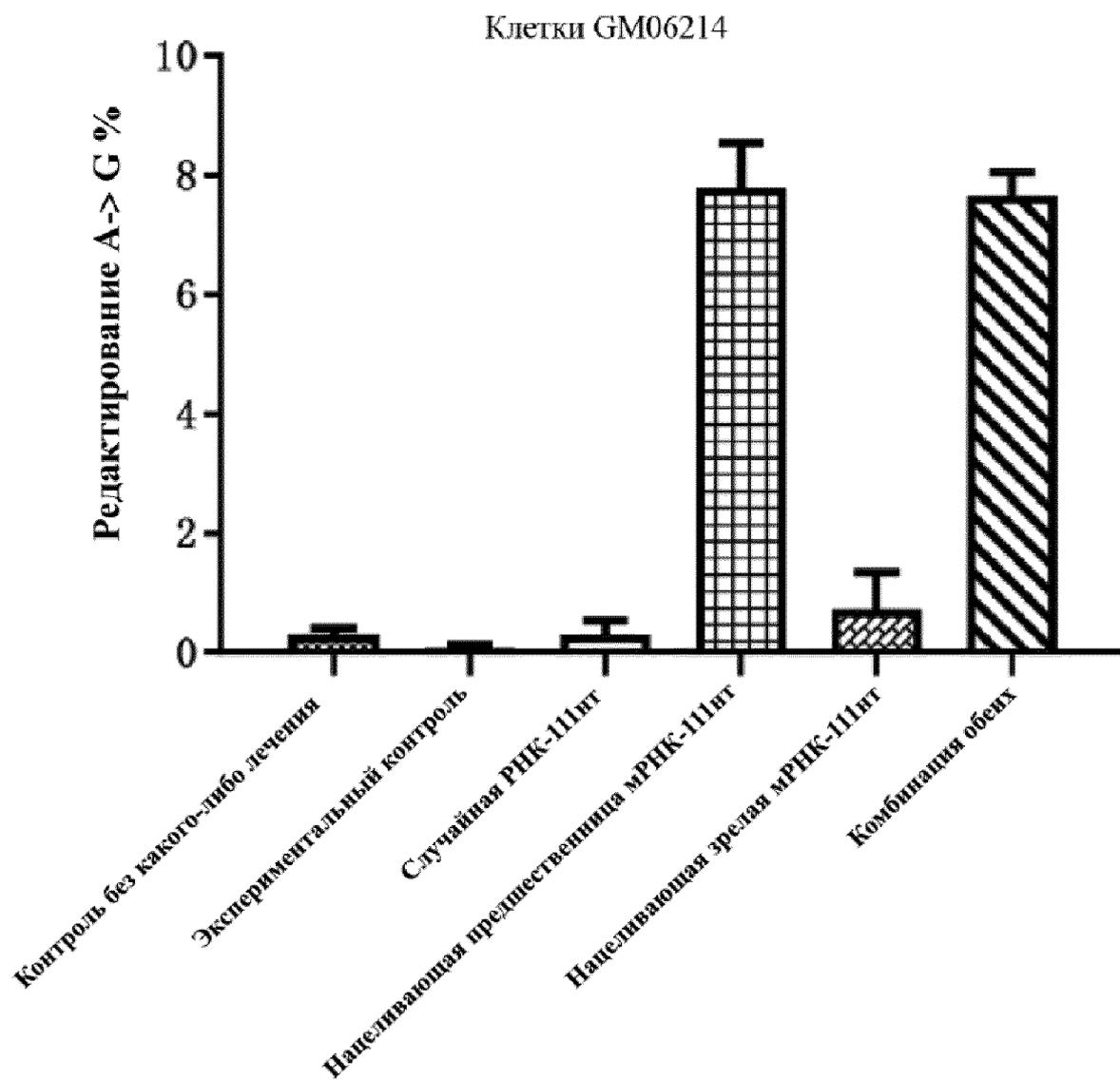
мРНК GFP (зеленого флуоресцентного белка):
Электротрансфекция клеток GM06214 с мРНК GFP при
различных условиях



Фигура 2

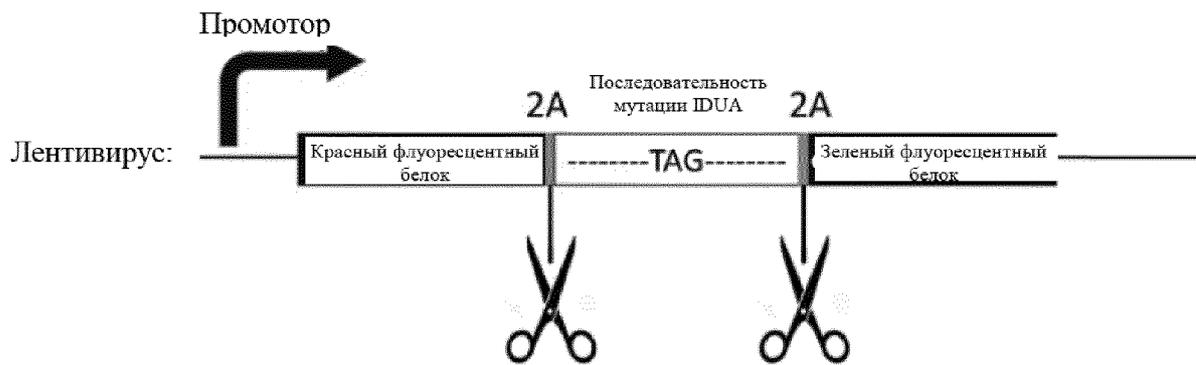


Фигура 3А

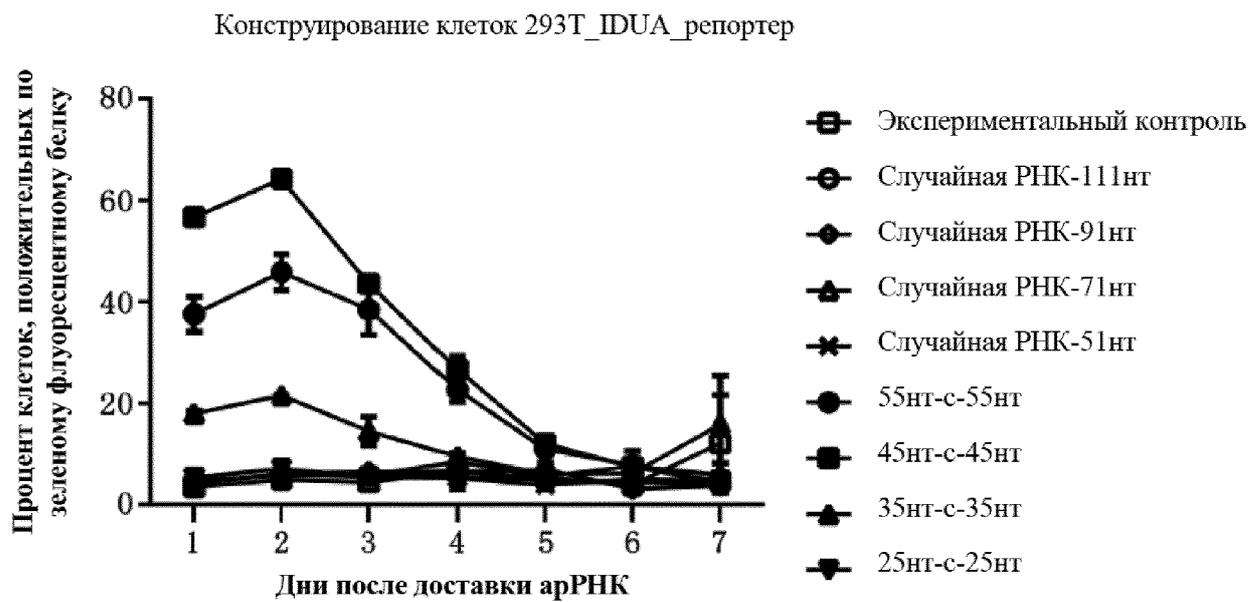


Фигура 3В

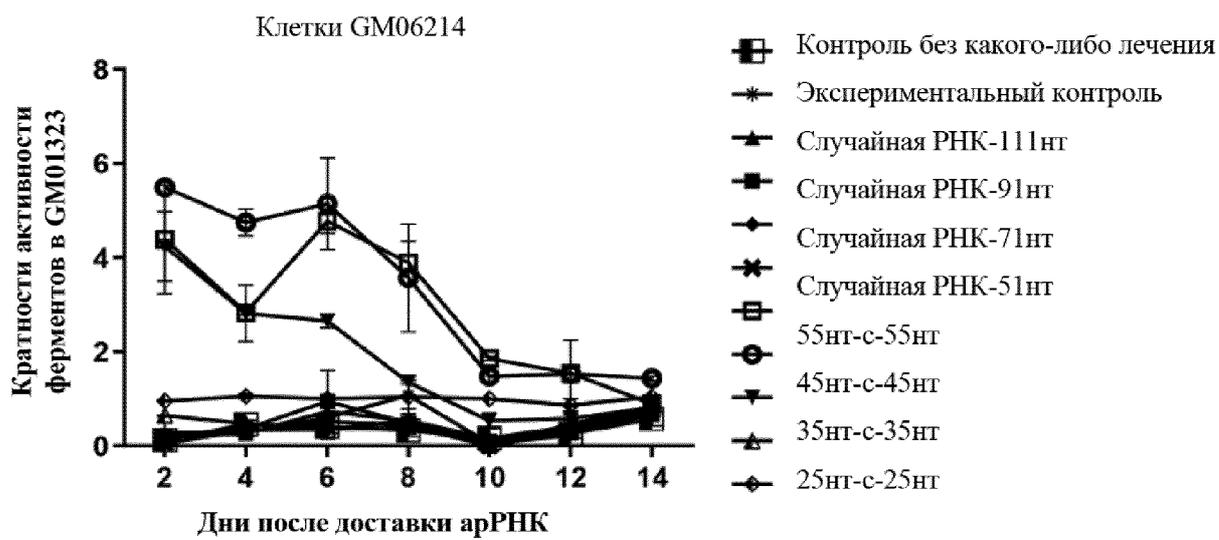
Конструирование системы 293T_IDUA_репортер



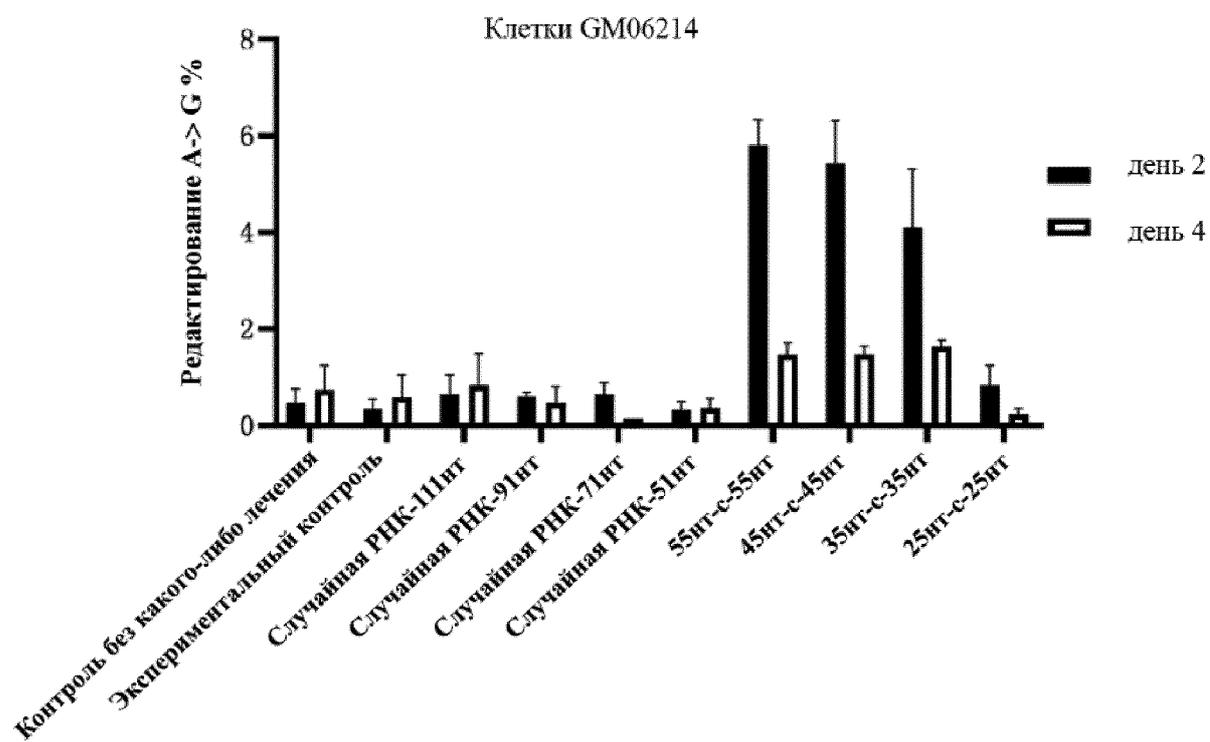
Фигура 4А



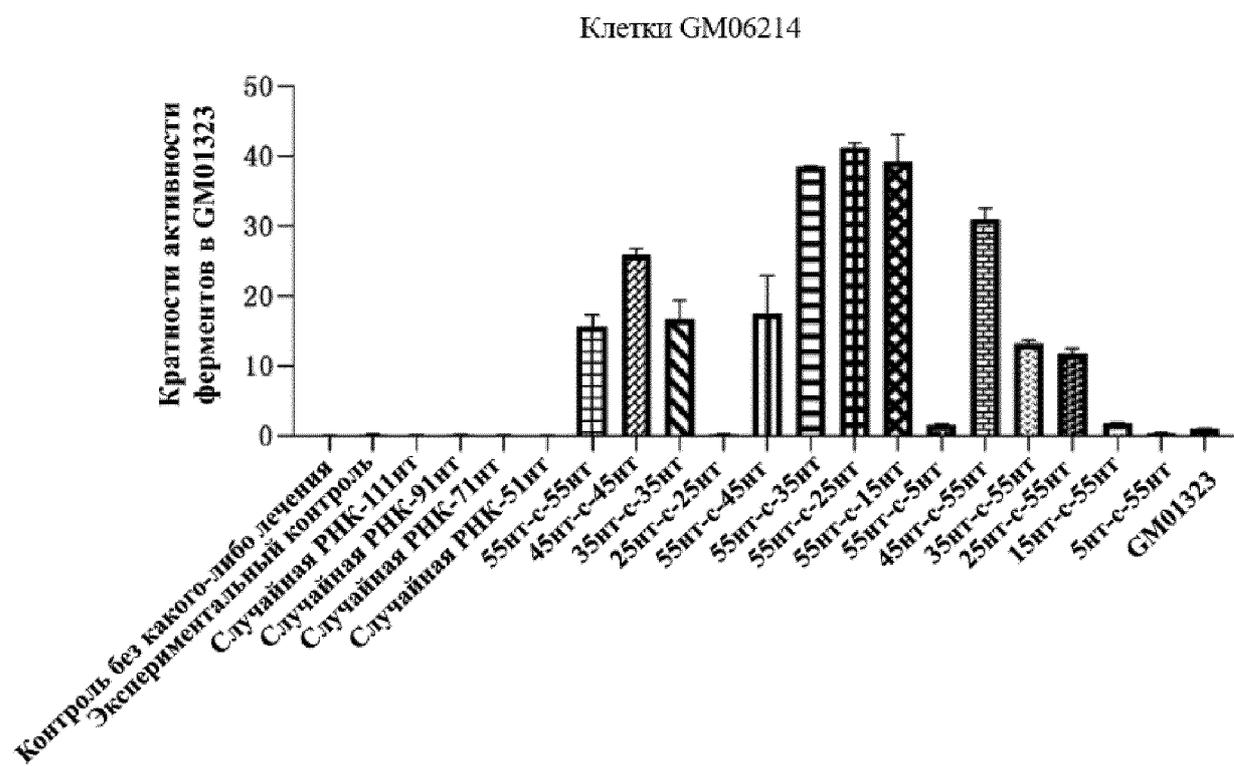
Фигура 4В



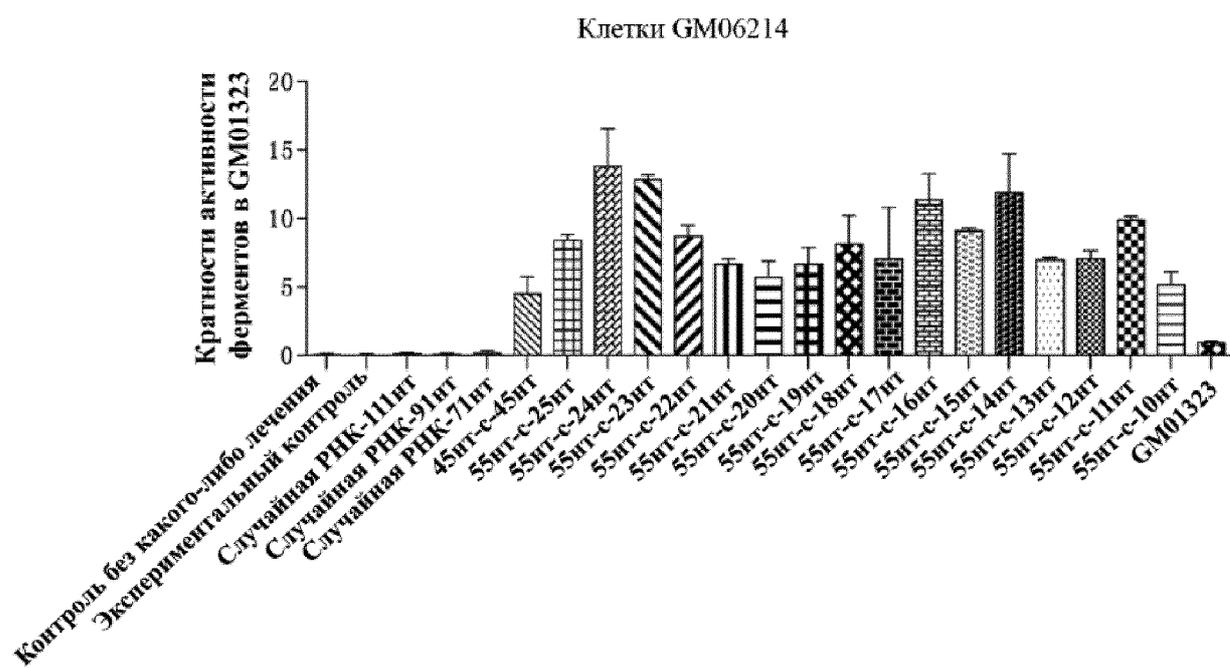
Фигура 5А



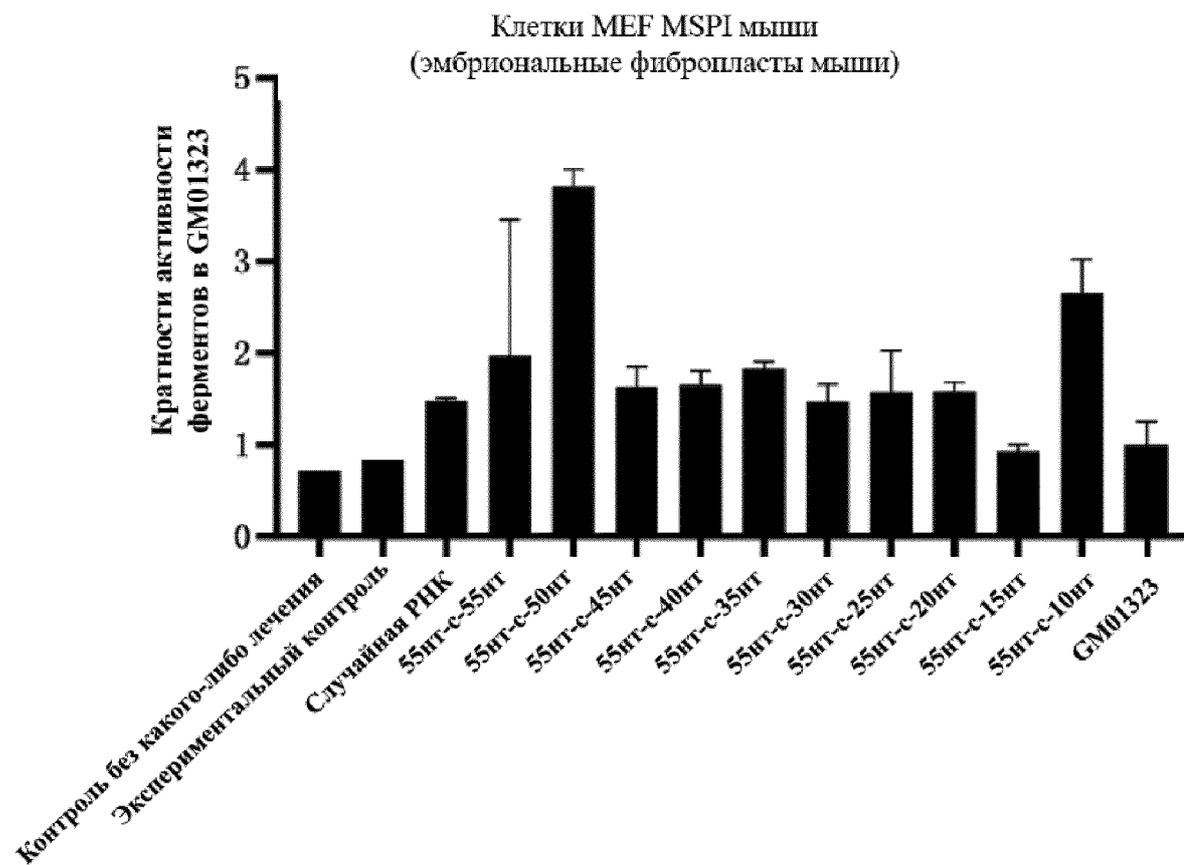
Фигура 5В



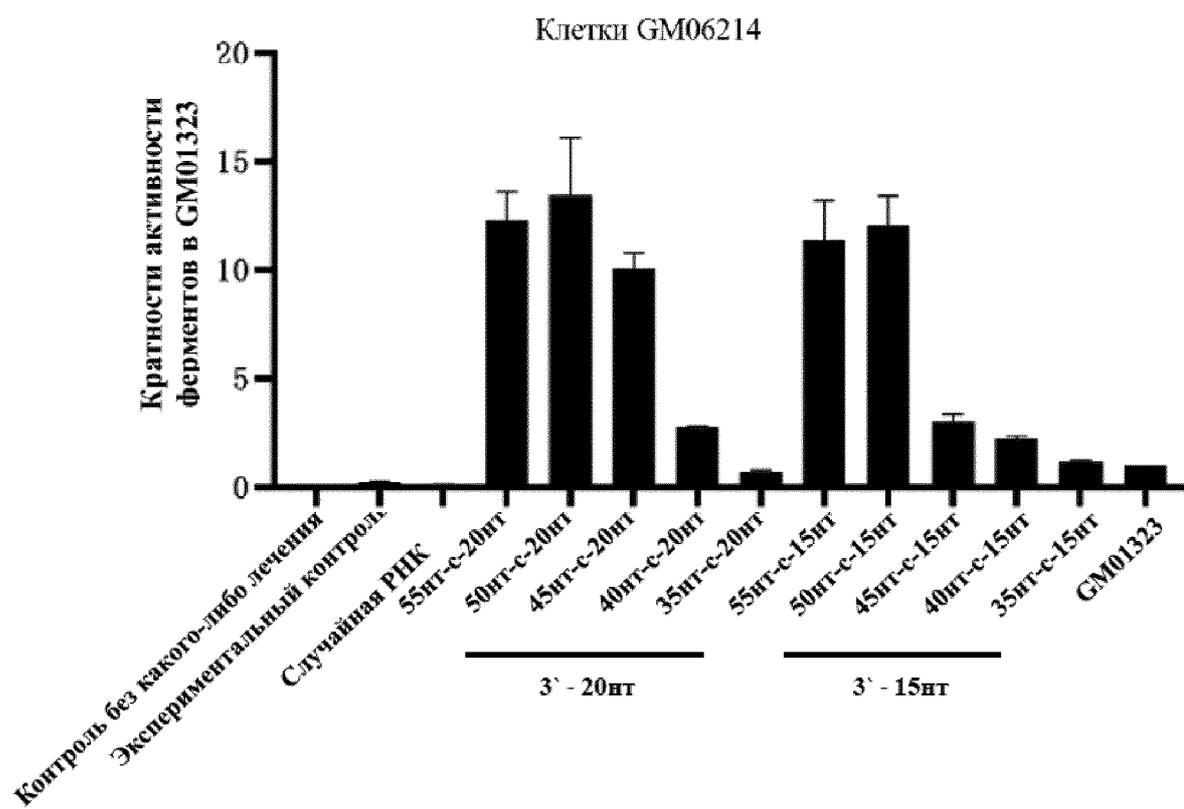
Фигура 6



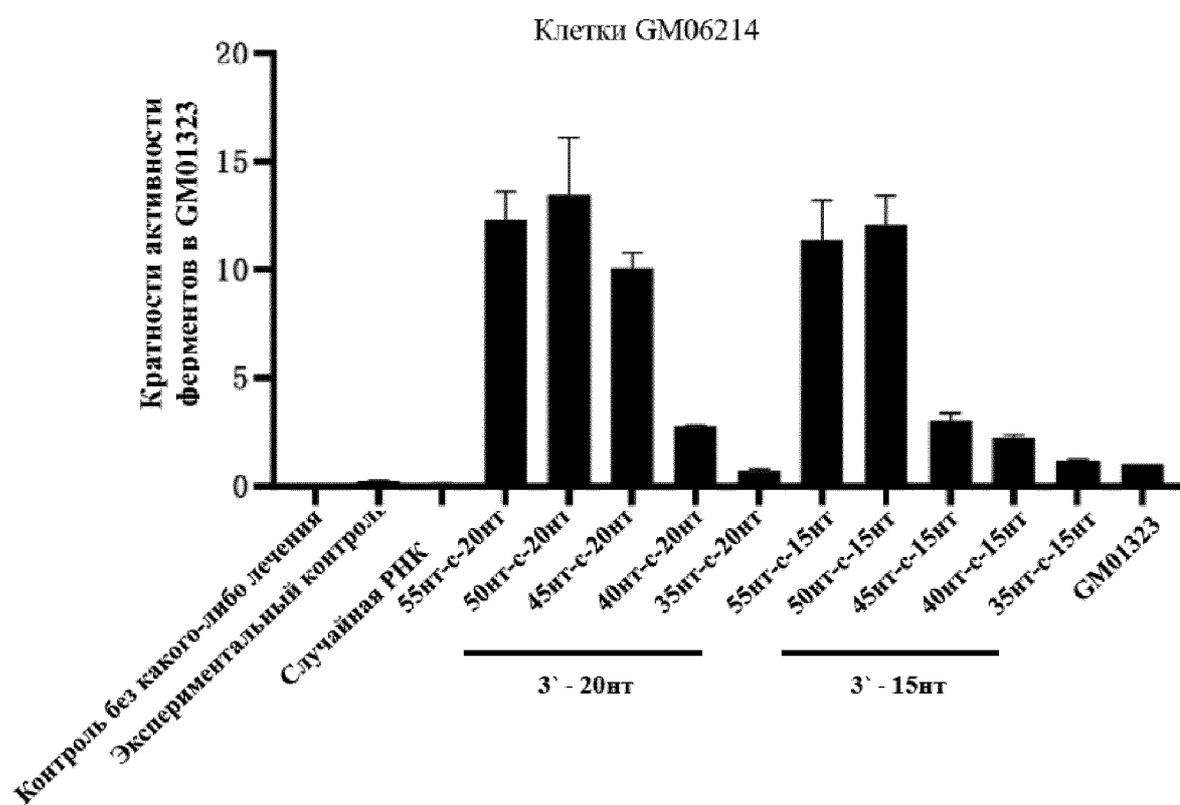
Фигура 7А



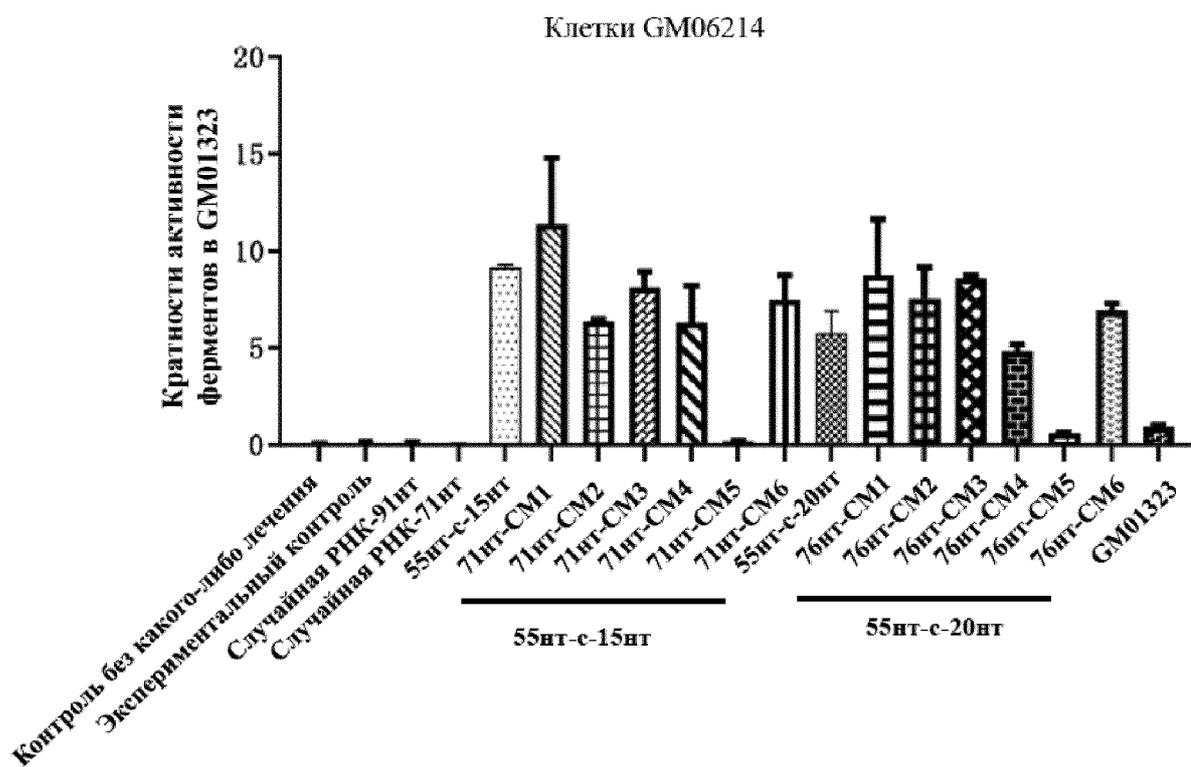
Фигура 7В



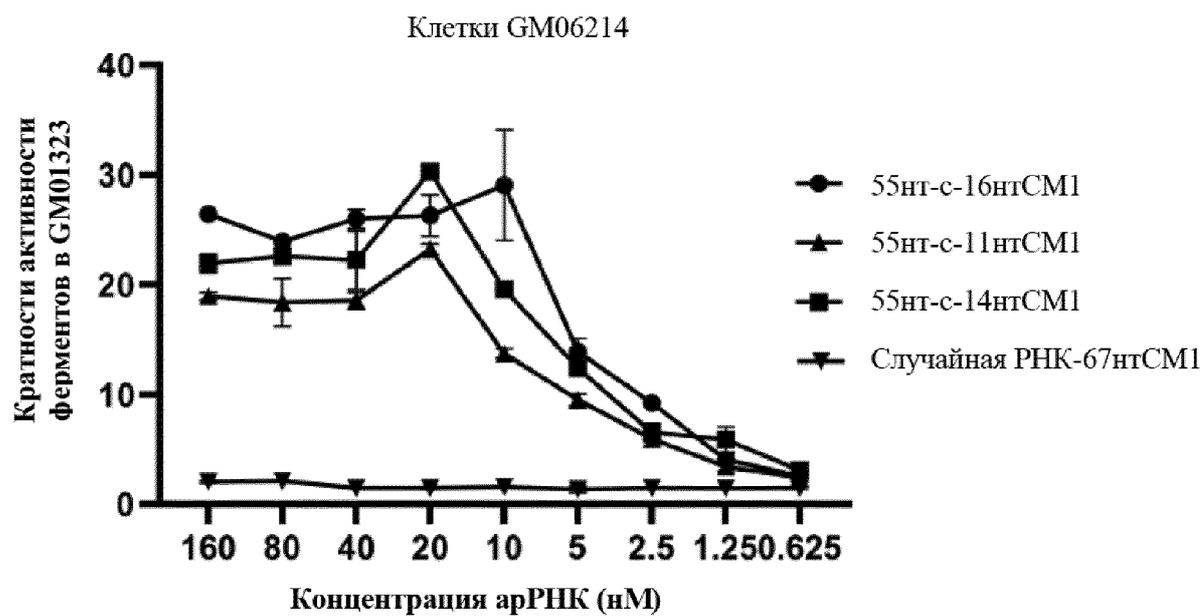
Фигура 8А



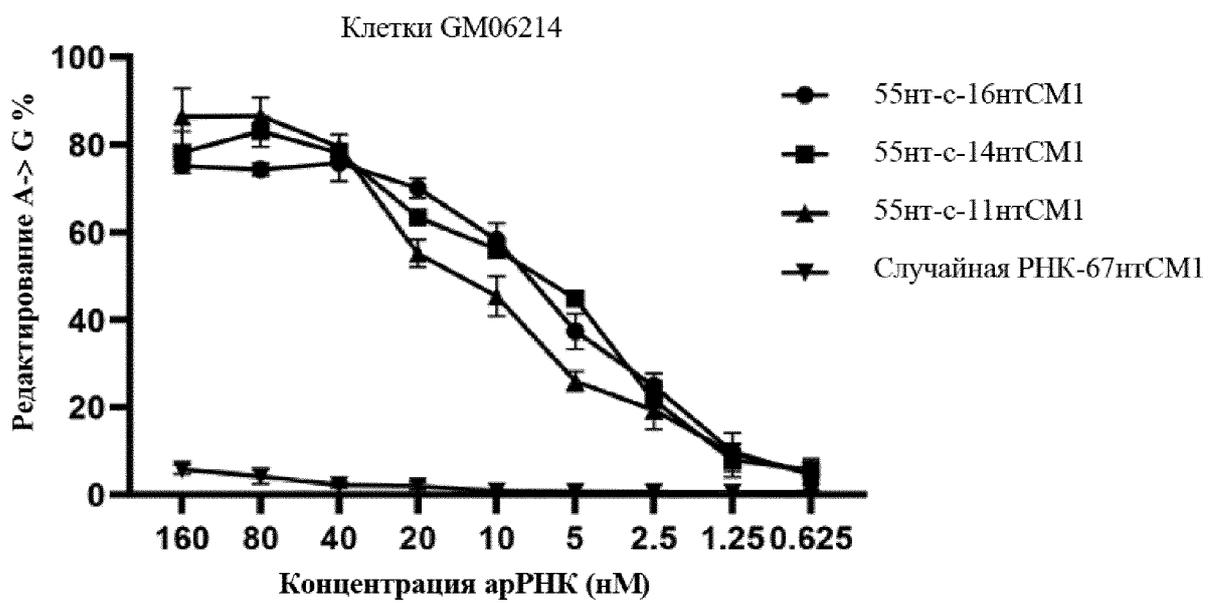
Фигура 8В



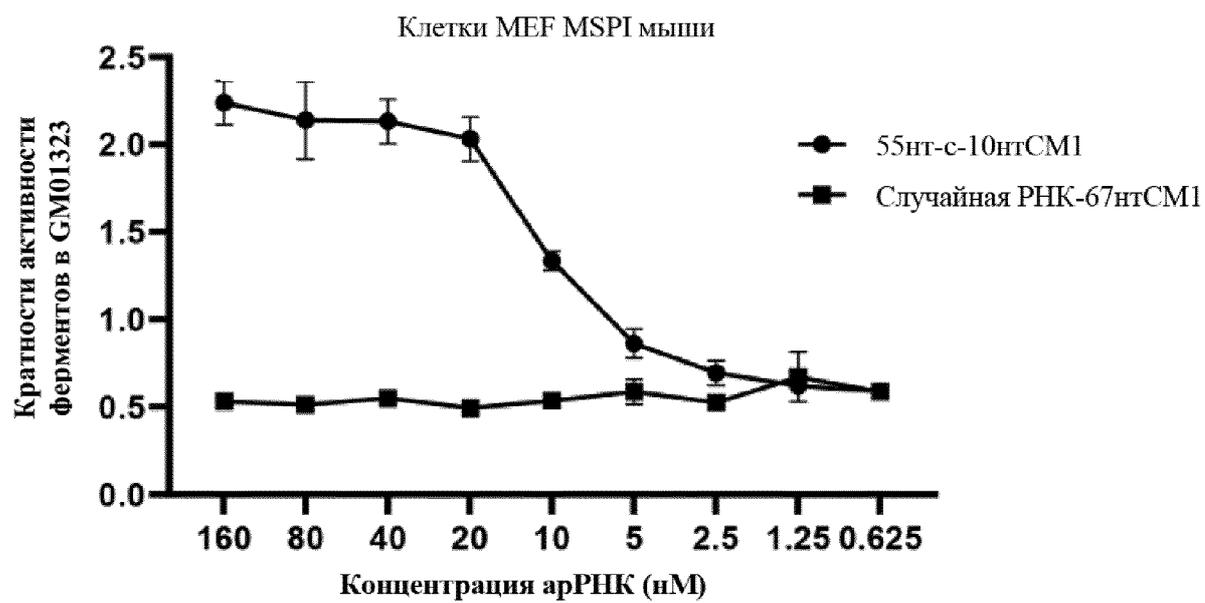
Фигура 9



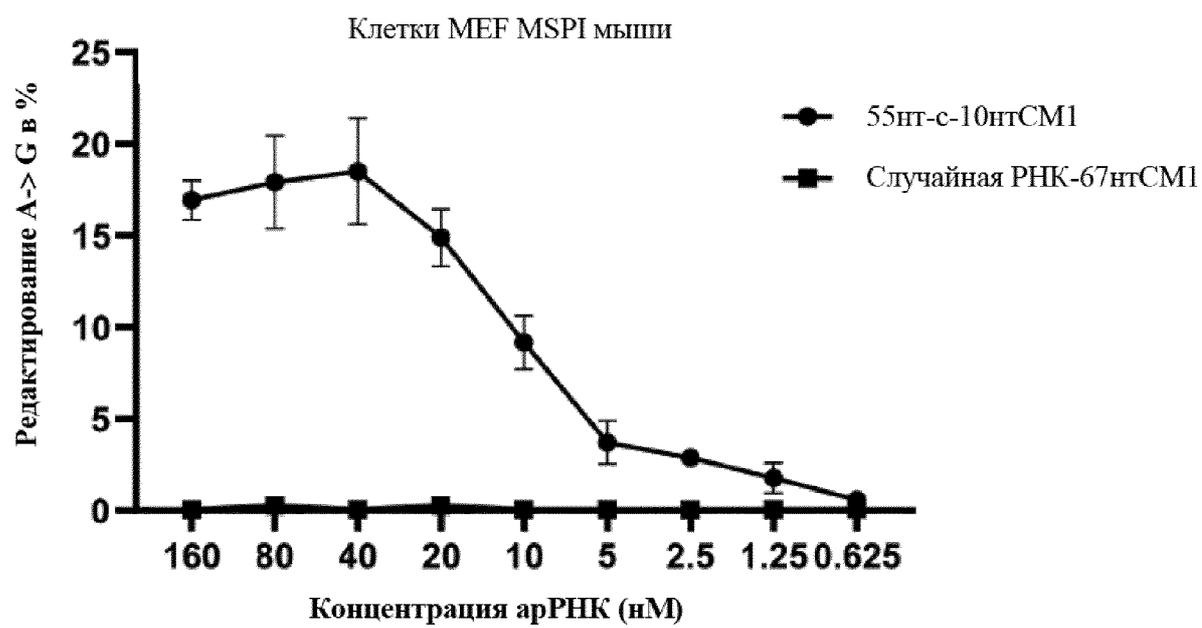
Фигура 10А



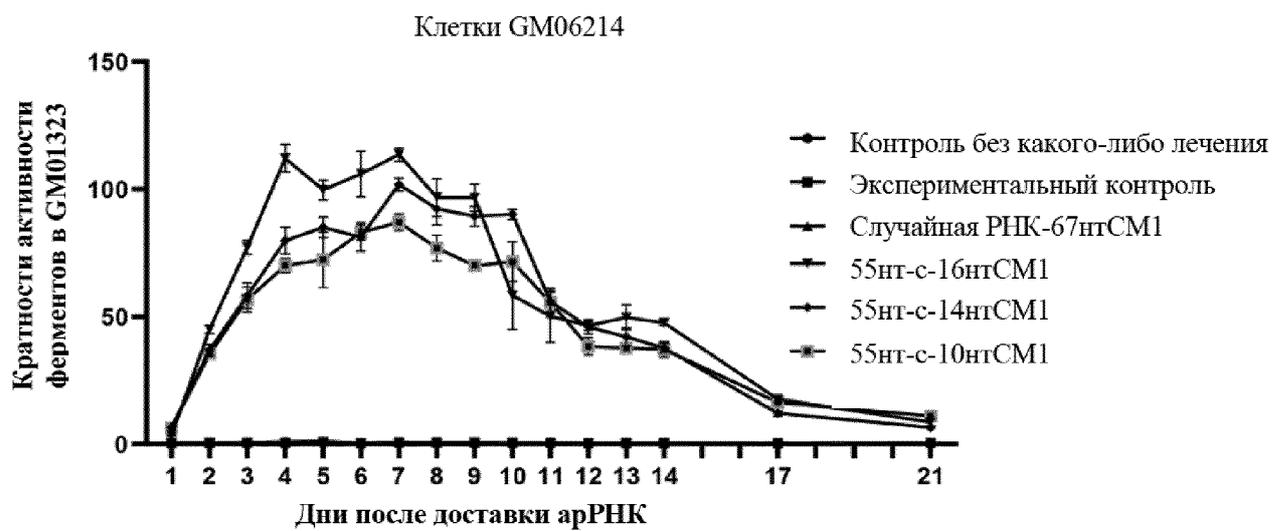
Фигура 10В



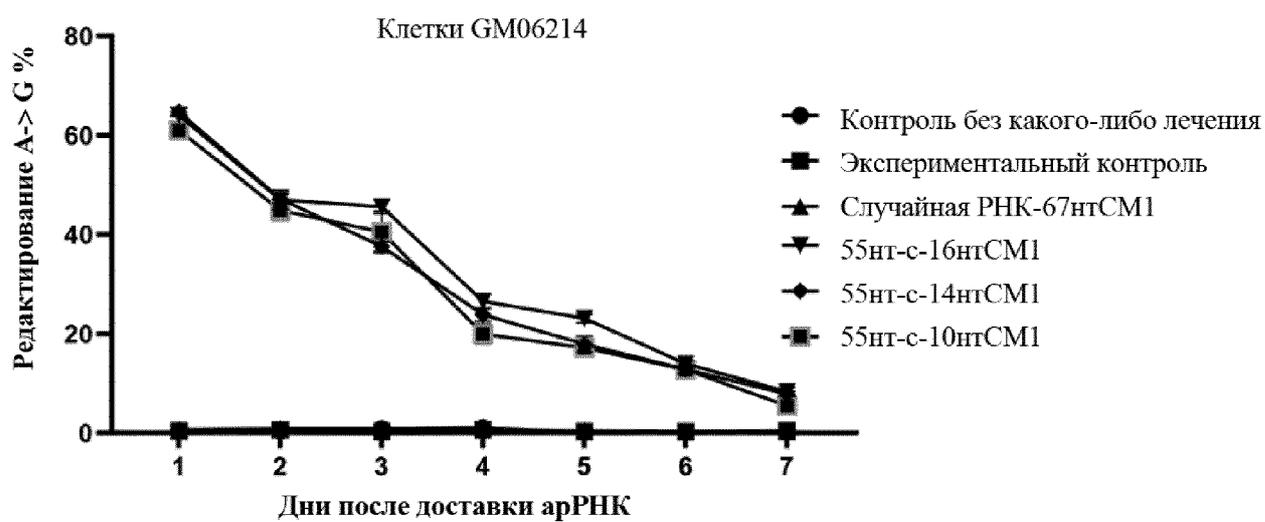
Фигура 10С



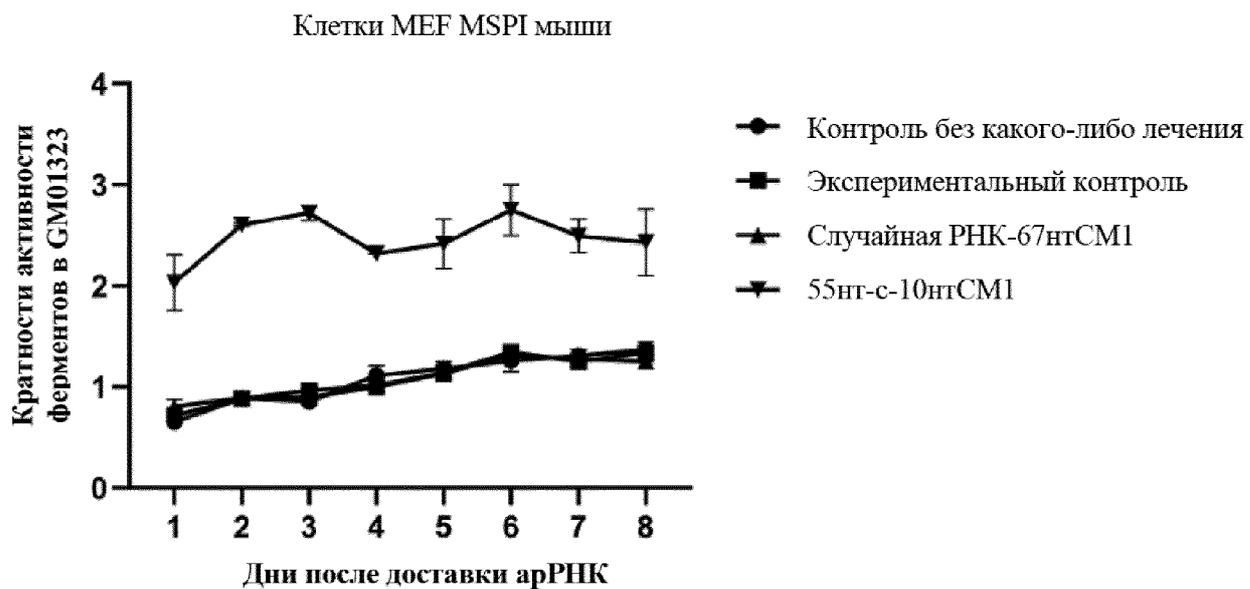
Фигура 10D



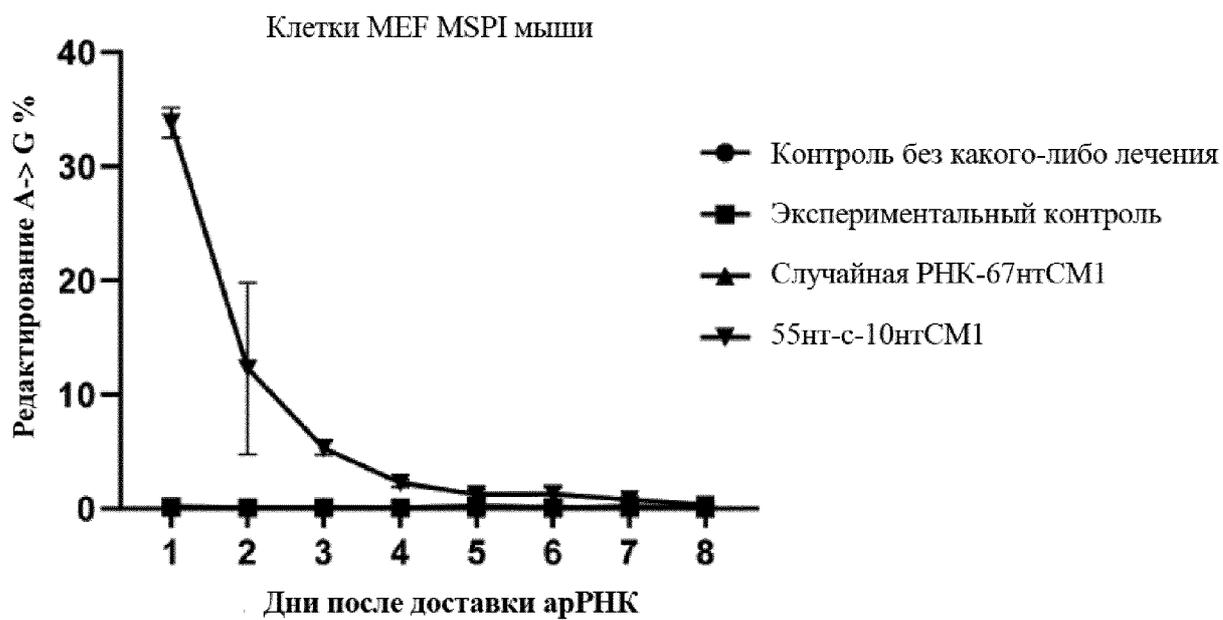
Фигура 11А



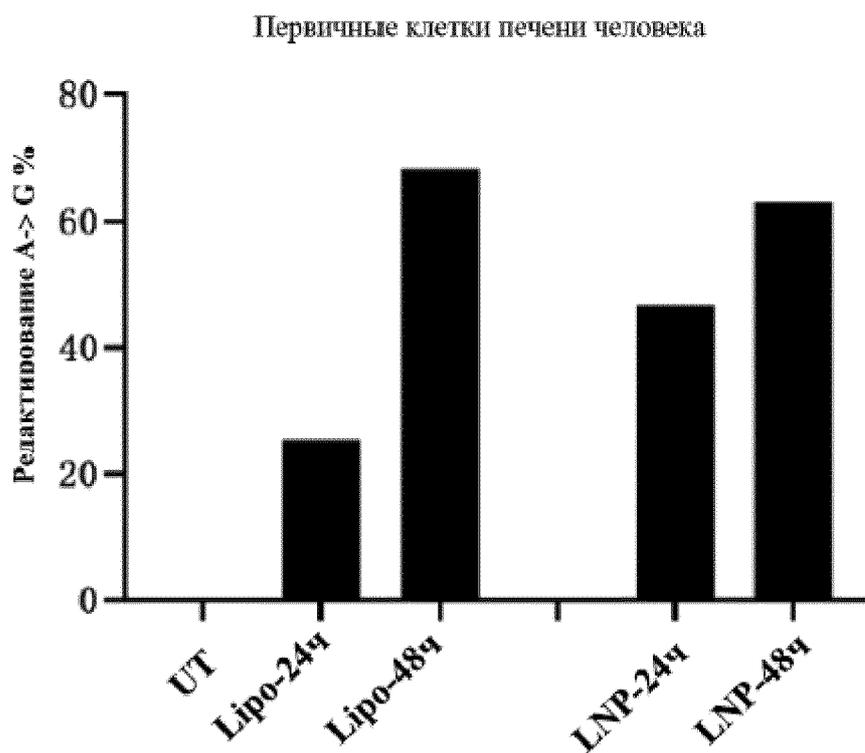
Фигура 11В



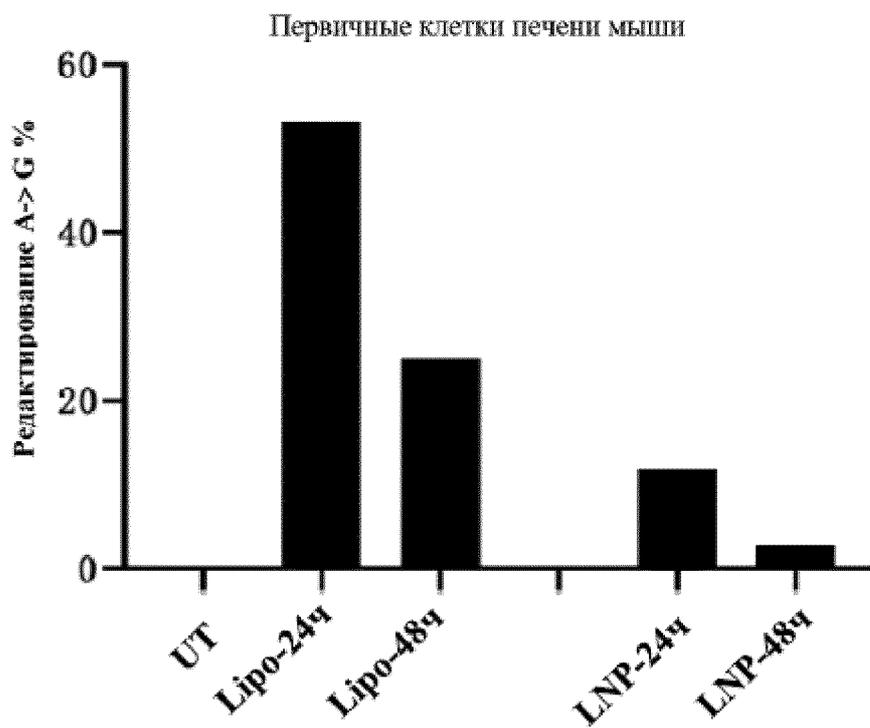
Фигура 11С



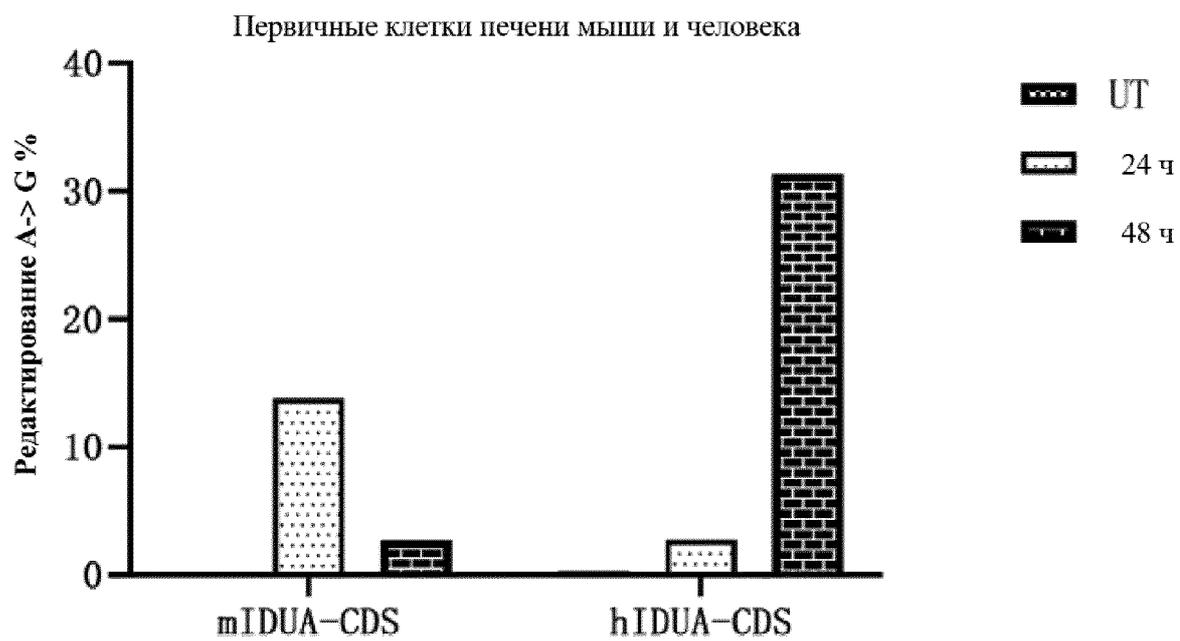
Фигура 11D



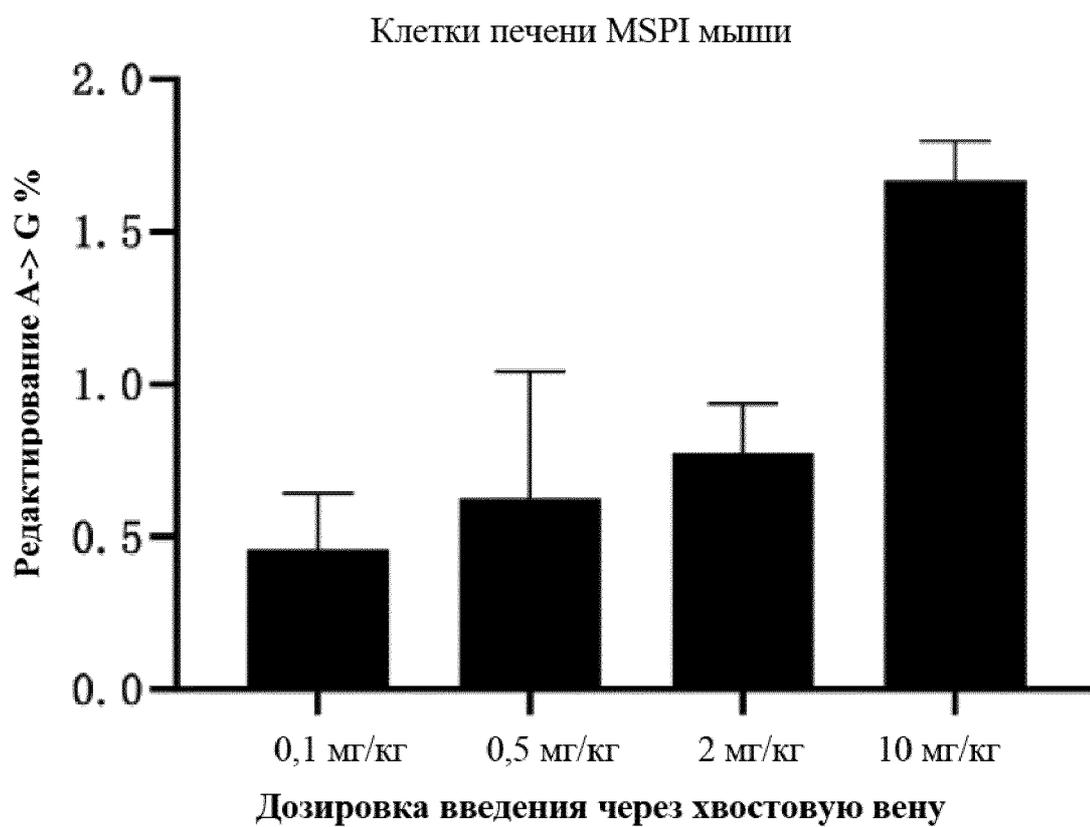
Фигура 12А



Фигура 12В



Фигура 13



Фигура 14