

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202292624 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.12.27(22) Дата подачи заявки
2021.04.15(51) Int. Cl. *A61K 48/00* (2006.01)
C12N 15/113 (2010.01)
C12N 15/11 (2006.01)
C12N 15/88 (2006.01)
A61P 3/00 (2006.01)

(54) СПОСОБ И ЛЕКАРСТВЕННОЕ СРЕДСТВО ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ СИНДРОМА ГУРЛера

(31) PCT/CN2020/084925

(32) 2020.04.15

(33) CN

(86) PCT/CN2021/087534

(87) WO 2021/209010 2021.10.21

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

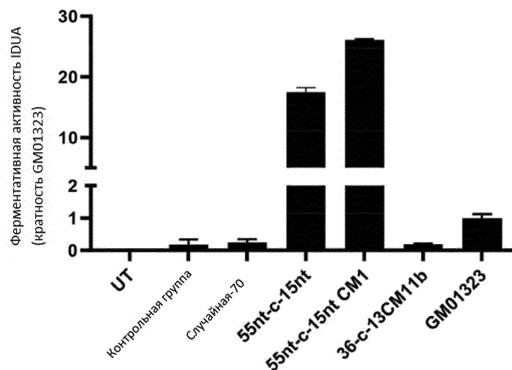
(72) Изобретатель:

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

(74) Представитель:

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

(57) Раскрыты лекарственное средство на основе нуклеиновой кислоты, основанное на технологии LEAPER, и способ лечения заболеваний, таких как синдрома Гурлера, посредством применения лекарственного средства на основе нуклеиновой кислоты для нацеливания и редактирования РНК. Способ включает выполнение редактирования аденозинового основания в гипоксантиновое основание на РНК с использованием лекарственного средства на основе нуклеиновой кислоты для точного восстановления сайта патогенной мутации G>A, например, при синдроме Гурлера; и тем самым восстановление нормальной экспрессии *in vivo* белка, кодируемого РНК, такого как IDUA.



A1

202292624

202292624

A1

СПОСОБ И ЛЕКАРСТВЕННОЕ СРЕДСТВО ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ СИНДРОМА ГУРЛЕРА

ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

Настоящая заявка относится к области терапии на основе редактирования генов и, в частности, к способу устранения мутации, вызывающей заболевание, на основе технологии LEAPER (использование эндогенного ADAR (аденозиндезаминаза, действующая на РНК) для программируемого редактирования РНК) для направленного редактирования РНК, который включает использование технологии LEAPER для сайт-направленного редактирования основания А-в-І на РНК для предотвращения или лечения заболевания, вызванного мутацией G>A, такого как синдром Гурлера.

ПРЕДШЕСТВУЮЩИЙ УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Синдром Гурлера, также известный как мукополисахаридоз ІІІ (MPS ІІІ), является наиболее тяжелым из трех подтипов MPSI (ІІ, ІІ/S и ІS). Это вызывающее потерю дееспособности и смертельное наследственное метаболическое заболевание, вызванное дефицитом α -L-идуронидазы (IDUA) у пациентов с этим заболеванием, и оно представляет собой аутосомно-рецессивное (AR) заболевание. Основной причиной синдрома Гурлера является мутация в гене IDUA, кодирующем белок IDUA на 4p16.3 на хромосоме 4 человека, и на сегодняшний день существует более 200 патогенных мутаций в синдроме Гурлера, наиболее распространенным типом среди которых является мутация G в A в положении 1205 на кДНК α -L-идуронидазы. Эта мутация превращает исходный триптофан в стоп-кодон, что, в свою очередь, приводит к отсутствию в конечном транслированном белке всех аминокислот после этого сайта (NM_000203.4(IDUA)-c.1205G>A (p.Trp402Ter)), тем самым приводя к потере всей ферментативной активности IDUA. На этот тип мутаций может приходиться вплоть до 63 % общей заболеваемости населения (Worldwide distribution of common IDUA pathogen variants, Poletto, Edina (2018). Clinical Genetics. 94. 10.1111/cge.13224). IDUA отвечает за деградацию глюкозаминогликанов (ГАГ) в лизосомах. Пациенты с синдромом Гурлера сильно различаются между собой и могут быть нормальными при рождении. Самыми ранними признаками синдрома Гурлера являются грубые контуры лица в возрасте 3-6 месяцев, за которыми следуют

выступающие лобные кости, деформации скелета, остановка роста, нарушения речи и т. д., и такие пациенты обычно не живут больше 10 лет.

Способа для полного излечения от синдрома Гурлера не существует, и два утвержденных метода лечения известны как: ферментозаместительная терапия (ФЗТ) и трансплантация гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК). ФЗТ показала хорошие результаты с точки зрения висцерального фенотипа, включая уменьшение размера печени, улучшение дыхательной функции и общее улучшение мобильности пациентов. К сожалению, она не достигает центральной нервной системы, и поэтому не предотвращает когнитивных нарушений. С другой стороны, успешная ТГСК предотвращает большинство клинических симптомов, включая симптомы со стороны нервной системы, но лечение должно проводиться до появления клинических симптомов (предпочтительно до 8-месячного возраста), и такое лечение подходит только для пациентов с тяжелым заболеванием из-за его 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).

Принцип генной терапии синдрома Гурлера, изучаемый в настоящее время, заключается в направленной вставке последовательности кДНК, кодирующей нормальный белок IDUA, в геном гепатоцита с помощью нуклеазы цинкового пальца (ZFN) и аденоассоциированного вируса (AAV), но этот подход все еще не учитывает симптомы со стороны головного мозга, скелетной системы и других систем при синдроме Гурлера.

Кроме того, лечение с помощью редактирования ДНК является одной из относительно перспективных идей для разработки терапии, но потенциал с точки зрения ненаправленного использования является вопросом, вызывающим большую озабоченность. Теоретически, CRISPR (короткие палиндромные повторы, регулярно расположенные группами), технология редактирования генома, которая быстро развивается в последние годы, может быть использована для лечения синдрома Гурлера. Многие исследователи и биотехнологические компании также работают над тем, чтобы внедрить технологию в клиническую практику. Например, в сентябре 2019 года впервые были представлены результаты клинических испытаний по использованию технологии CRISPR для редактирования стволовых клеток и их переливания пациентам для лечения СПИДа и

лейкоза, что внесло большой вклад в перенос технологии CRISPR в направлении генной терапии. Хотя технология CRISPR имеет широкий спектр потенциальных применений, она также имеет ряд недостатков, которые делают ее перенос со стадии исследований на клинические терапевтические применения затруднительным. Одной из проблем является ключевой фермент, используемый в технологии CRISPR: Cas. Технология редактирования ДНК на основе CRISPR требует экзогенной экспрессии Cas9 или других нуклеаз со схожими функциями, что создает несколько следующих проблем. Во-первых, нуклеазы, которые обычно требуют экзогенной экспрессии, имеют большую молекулярную массу, что делает их доставку в организм через вирусные векторы значительно менее эффективной. Во-вторых, экзогенная экспрессия нуклеаз делает возможной нецелевую экспрессию нуклеаз, делая их применения потенциально онкогенными. Наконец, экзогенно экспрессированные нуклеазы чаще обнаруживаются у бактерий, чем встречаются в природе у людей или млекопитающих, что делает возможным индуцирование иммунного ответа у пациентов, который может, с одной стороны, нанести ущерб самим пациентам, а с другой стороны, сделать экзогенно экспрессированные нуклеазы нейтрализованными и, таким образом, потерявшими свою надлежащую активность, или препятствующими дальнейшему вмешательству и терапии.

В 2017 году группа Фэн Чжана (Feng Zhang) сообщила о технологии редактирования РНК под названием REPAIR (редактирование РНК для программируемой замены А на Г) (RNA editing with CRISPR-Cas13, Cox et al., 2017), которая также обеспечивает редактирование А в Г целевых РНК с помощью экзогенной экспрессии слитых белков Cas13-ADAR и одиночных направляющих РНК (sgRNA), аналогично технологии CRISPR, указанный метод по-прежнему требует экспрессии экзогенных белков. Проблема, вызванная экспрессией экзогенных белков, не может быть решена.

В 2017 году международная заявка PCT/EP2017/071912 раскрыла более подходящий способ редактирования *in vivo*. Этот способ не требует экзогенных белков и основывается только на введении в клетку небольшого сегмента РНК, комплементарно спаренного с последовательностью, в которой находится целевой сайт, для рекрутирования белков ADAR для редактирования целевого сайта на РНК. Комплементарная РНК, используемая в этом способе, имеет короткую длину (менее 54 nt (нуклеотид)), но требует сложных химических

модификаций и не является эффективной с точки зрения редактирования.

В январе 2019 года группа Торстена Стаффорста (Thorsten Stafforst) сообщила о технологии редактирования нуклеиновой кислоты под названием RESTORE (рекрутирование эндогенного ADAR к специфическим транскриптам для олигонуклеотид-опосредованного редактирования РНК, Merkle et al., 2019). Эта технология также способна избежать от зависимости от экзогенных белков. Однако технология RESTORE требует наличия IFN- γ , чтобы иметь высокую эффективность редактирования, в то время как IFN- γ является ключевым фактором в определении развития и тяжести аутоиммунитета (Interferon- γ and systemic autoimmunity, Pollard et al., 2013), что значительно уменьшает применение данной технологии в медицинской области.

PCT/CN2018/110105, PCT/CN/2019/082713 и PCT/CN/2019/110782 раскрывают способ редактирования РНК под названием «LEAPER» (использование эндогенного ADAR для программируемого редактирования на РНК), технологию, которая рекрутирует белки ADAR для редактирования целевых сайтов на РНК путем введения в клетку сегмента РНК, комплементарно спаренного с последовательностью на целевом сайте. РНК, комплементарно спаренная с последовательностью целевого сайта, используемого в этой технологии, может стимулировать относительно эффективное редактирование РНК в целевом сайте без какой-либо модификации.

Несмотря на то, что в предшествующем уровне техники существуют различные способы редактирования генов или редактирования РНК, в данной области техники существует направление исследования того, какой способ может фактически достичь устранения мутации, вызывающей заболевание, для конкретного заболевания, такого как синдром Гурлера, и может достичь уровня клинического применения.

КРАТКОЕ СОДЕРЖАНИЕ ЗАЯВКИ

Для синдрома Гурлера, вызванного мутацией G>A в гене α -L-идуронидазы (IDUA), в настоящей заявке предложен способ направленного редактирования целевой РНК, содержащей мутацию, в клетке на основе технологии LEAPER. В способе по настоящей заявке может быть достигнута высокая эффективность редактирования мутации G>A в гене IDUA, путем коррекции патогенной мутации G>A уровень и активность IDUA могут

быть восстановлены в некоторой степени, тем самым открывая новый путь для эффективного лечения синдрома Гурлера.

В частности, настоящая заявка относится к следующему:

1. Способ направленного редактирования целевой РНК в клетке на основе технологии LEAPER, где целевая РНК содержит последовательность транскрипта гена α -L-идуронидазы (IDUA), содержащую сайт мутации гуанозина (G) в аденозин (A) (целевой аденозин), причем указанный способ включает:

введение в клетку арРНК (РНК, рекрутирующая аденозиндезаминазу) или конструкции, содержащей кодирующую последовательность арРНК, где арРНК содержит комплементарную последовательность РНК, которая гибридизуется с целевой РНК, и где арРНК путем гибридизации с целевой РНК способна рекрутировать аденозиндезаминазу, действующую на РНК (ADAR), которая дезаминирует целевой аденозин в целевой РНК.

2. Способ по п. 1, где нуклеотид (называемый нацеливающим нуклеотидом) в арРНК, который расположен напротив целевого аденозина, представляет собой цитидин (C), аденозин (A) или уридин (U). В некоторых вариантах осуществления нацеливающий нуклеотид, который расположен напротив целевого аденозина, представляет собой C.

3. Способ по п. 1 или п. 2, где целевой аденозин образует целевой триплет вместе со своим 5'-ближайшим нуклеотидом и 3'-ближайшим нуклеотидом, и указанный целевой триплет представляет собой 5'-UAG-3'.

4. Способ по любому из пп. 1-3, где 5'-ближайший нуклеотид нацеливающего нуклеотида представляет собой цитидин (C), гуанозин (G) или уридин (U).

5. Способ по любому из пп. 1-4, где 3'-ближайший нуклеотид нацеливающего нуклеотида представляет собой аденозин (A).

6. Способ по любому из пп. 1-5, где нацеливающий нуклеотид образует нацеливающий триплет вместе со своим 5'-ближайшим нуклеотидом и 3'-ближайшим нуклеотидом, и указанный нацеливающий триплет представляет собой 5'-CCA-3'.

7. Способ по любому из пп. 1-6, где длина арРНК составляет более 61 nt, например, длина арРНК составляет от 62 до 121 nt, от 62 до 111 nt, от 62 до 101 nt, от 62 до 91 nt, от 62 до 81 nt или от 62 до 76 nt. В некоторых вариантах осуществления длина арРНК представляет собой длину, равную любому целому числу нуклеотидов, выбранному из

62-121 nt. В некоторых конкретных вариантах осуществления длина арРНК составляет, например, 62 nt, 63 nt, 64 nt, 65 nt, 66 nt, 67 nt, 68 nt, 69 nt, 70 nt, 71 nt, 72 nt, 73 nt, 74 nt, 75 nt, 76 nt, 77 nt, 78 nt, 79 nt, 80 nt, 81 nt, 82 nt, 83 nt, 84 nt, 85 nt, 86 nt, 87 nt, 88 nt, 89 nt, 90 nt, 92 nt, 95 nt, 98 nt, 100 nt, 103 nt или 106 nt.

8. Способ по любому из пп. 1-7, где расстояние от нацеливающего нуклеотида арРНК до 3'-конца арРНК меньше расстояния от нацеливающего нуклеотида до 5'-конца арРНК. В некоторых вариантах осуществления расстояние от нацеливающего нуклеотида арРНК до 3'-конца арРНК равно расстоянию от нацеливающего нуклеотида до 5'-конца арРНК. В некоторых вариантах осуществления расстояние от нацеливающего нуклеотида арРНК до 3'-конца арРНК больше, чем расстояние от нацеливающего нуклеотида до 5'-конца арРНК.

9. Способ по любому из пп. 1-8, где расстояние от нацеливающего нуклеотида арРНК до 3'-конца арРНК составляет более 8 nt, например, от 9 до 60 nt, предпочтительно от 9 до 45 nt или от 9 до 35 nt; в некоторых вариантах осуществления для того, чтобы избежать сверхдлинной поли G-структуры, расстояние от нацеливающего нуклеотида арРНК до 3'-конца арРНК выбрано из: от 9 до 25 nt, от 9 до 26 nt или от 9 до 27 nt; предпочтительно в некоторых вариантах осуществления расстояние от нацеливающего нуклеотида арРНК до 3'-конца арРНК выбрано из: от 9 до 20 nt, от 9 до 21 nt или от 9 до 22 nt; в некоторых конкретных вариантах осуществления расстояние от нацеливающего нуклеотида арРНК до 3'-конца арРНК представляет собой целое число нуклеотидов, выбранное из от 9 до 25 nt, например, 10 nt, 11 nt, 12 nt, 13 nt, 14 nt, 15 nt, 16 nt, 17 nt, 18 nt, 19 nt, 23 nt или 24 nt.

10. Способ по любому из пп. 1-9, где расстояние от нацеливающего нуклеотида арРНК до 5'-конца арРНК составляет более 25 nt, например, от 26 до 60 nt, от 35 до 60 nt или от 45 до 60 nt; в некоторых предпочтительных вариантах осуществления расстояние от нацеливающего нуклеотида арРНК до 5'-конца арРНК выбрано из группы, состоящей из: 45 nt, 45 nt, 46 nt, 47 nt, 48 nt, 49 nt, 50 nt, 51 nt, 52 nt, 53 nt, 54 nt, 55 nt, 56 nt, 57 nt, 58 nt или 59 nt.

11. Способ по любому из пп. 1-7, где расстояние от нацеливающего нуклеотида арРНК до 5'-конца арРНК меньше расстояния от нацеливающего нуклеотида арРНК до

3'-конца арРНК.

12. Способ по п. 11, где расстояние от нацеливающего нуклеотида арРНК до 5'-конца арРНК составляет более 35 nt, например, от 36 до 60 nt или от 36 до 55 nt; предпочтительно расстояние от нацеливающего нуклеотида арРНК до 5'-конца арРНК выбрано из группы, состоящей из: 54 nt, 53 nt, 52 nt, 51 nt, 50 nt, 49 nt, 48 nt, 47 nt, 46 nt, 45 nt, 44 nt, 43 nt, 42 nt, 41 nt, 40 nt, 39 nt, 38 nt или 36 nt.

13. Способ по любому из пп. 1-12, где арРНК представляет собой арРНК, имеющую характеристику длины, выбранную из группы, состоящей из:

55nt-c-35nt, 55nt-c-25nt, 55nt-c-24nt, 55nt-c-21nt, 55nt-c-20nt, 55nt-c-19nt, 55nt-c-18nt, 55nt-c-17nt, 55nt-c-16nt, 55nt-c-15nt, 55nt-c-14nt, 55nt-c-13nt, 55nt-c-12nt, 55nt-c-11nt, 55nt-c-10nt, 55nt-c-9nt, 50nt-c-20nt, 50nt-c-15nt, 45nt-c-55nt или 45nt-c-20nt.

14. Способ по любому из пп. 1-13, где арРНК представляет собой арРНК, имеющую характеристику длины, выбранную из группы, состоящей из: 55nt-c-20nt, 55nt-c-15nt или 55nt-c-14nt.

15. Способ по любому из пп. 1-14, где арРНК содержит одну или более химических модификаций.

16. Способ по п. 15, где химическая модификация представляет собой одну или более модификаций, выбранных из группы, состоящей из:

модификации путем 2'-О-метилирования, модификации фосфоротиоатом, модификации путем дезоксирибонуклеотидной замены, LNA (блокированная нуклеиновая кислота) модификации и 2'-О-(2-метоксиэтиловой) модификации.

17. Способ по п. 15 или п. 16, где химическая модификация представляет собой одну или более модификаций, выбранных из группы, состоящей из:

- 1) модификаций путем 2'-О-метилирования в первых 2, 3, 4 или 5 нуклеотидах;
- 2) модификаций путем 2'-О-метилирования в последних 2, 3, 4, или 5 нуклеотидах;
- 3) модификаций путем 2'-О-метилирования во всех цитидинах за исключением тех, которые находятся в нацеливающем триплете;
- 4) 2'-О-(2-метоксиэтиловых) модификаций в первых 2, 3 или 4 нуклеотидах;
- 5) 2'-О-(2-метоксиэтиловых) модификаций в последних 2, 3 или 4 нуклеотидах;
- 6) модификаций путем дезоксирибонуклеотидной замены первых 2, 3 или 4

нуклеотидов;

7) модификаций путем дезоксирибонуклеотидной замены последних 2, 3 или 4 нуклеотидов;

8) модификаций фосфоротиоатом в первых 1, 2, 3, 4 или 5 межнуклеотидных связях;

9) модификаций фосфоротиоатом в последних 1, 2, 3, 4 или 5 межнуклеотидных связях;

10) модификаций фосфоротиоатом во всех межнуклеотидных связях за исключением того, что одна или более из 5'- или 3'-ближайших межнуклеотидных связей каждого из нуклеотидов в нацеливающем триplete не являются модифицированными фосфоротиоатом; и

11) модификаций фосфоротиоатом в межнуклеотидных связях с интервалом в 1, 2, 3 или 4 нуклеотида за исключением того, что одна или более из 5'- или 3'-ближайших межнуклеотидных связей каждого из нуклеотидов в нацеливающем триplete не являются модифицированными фосфоротиоатом.

18. Способ по п. 17, где химическая модификация представляет собой одну или более модификаций, выбранных из группы, состоящей из:

1) модификаций путем 2'-О-метиличования в первых 2, 3, 4 или 5 нуклеотидах и последних 2, 3, 4 или 5 нуклеотидах;

2) модификаций путем 2'-О-метиличования во всех цитидинах за исключением тех, которые находятся в нацеливающем триplete;

3) 2'-О-(2-метоксиэтиловых) модификаций в первых 2, 3 или 4 нуклеотидах и последних 2, 3 или 4 нуклеотидах;

4) модификаций путем дезоксирибонуклеотидной замены в первых 2, 3 или 4 нуклеотидах и последних 2, 3 или 4 нуклеотидах;

5) модификаций фосфоротиоатом в первых 1, 2, 3, 4 или 5 межнуклеотидных связях и последних 1, 2, 3, 4 или 5 межнуклеотидных связях;

6) модификаций фосфоротиоатом во всех межнуклеотидных связях или по меньшей мере в каждой второй межнуклеотидной связи, за исключением того, что одна или более из 5'- или 3'-ближайших межнуклеотидных связей нуклеотидов в нацеливающем триplete не модифицированы фосфоротиоатом.

19. Способ по любому из пп. 15-18, где арРНК содержит любую химическую модификацию, выбранную из группы, состоящей из:

СМ0: первые 3 и последние 3 нуклеотида в последовательности арРНК соответственно модифицированы путем 2'-О-метиличования, и первые 3 и последние 3 межнуклеотидные связи в последовательности арРНК соответственно модифицированы фосфоротиоатом;

СМ1: первые 3 и последние 3 нуклеотида в последовательности арРНК соответственно модифицированы путем 2'-О-метиличования, первые 3 и последние 3 межнуклеотидные связи в последовательности арРНК соответственно модифицированы фосфоротиоатом и все уридины последовательности модифицированы путем 2'-О-метиличования;

СМ2: первые 3 и последние 3 нуклеотида в последовательности арРНК соответственно модифицированы путем 2'-О-метиличования, и первые 3 и последние 3 межнуклеотидные связи в последовательности арРНК соответственно модифицированы фосфоротиоатом; и 3'-ближайший нуклеотид нацеливающего нуклеотида модифицирован путем 2'-О-метиличования;

СМ3: первые 3 и последние 3 нуклеотида в последовательности арРНК соответственно модифицированы путем 2'-О-метиличования, и первые 3 и последние 3 межнуклеотидные связи в последовательности арРНК соответственно модифицированы фосфоротиоатом; и 5'-ближайший нуклеотид нацеливающего нуклеотида модифицирован путем 2'-О-метиличования;

СМ4: первые 3 и последние 3 нуклеотида в последовательности арРНК соответственно модифицированы путем 2'-О-метиличования, и первые 3 и последние 3 межнуклеотидные связи в последовательности арРНК соответственно модифицированы фосфоротиоатом; и 3'-ближайшая межнуклеотидная связь каждого из трех оснований в нацеливающем триplete соответственно модифицирована фосфоротиоатом;

СМ6: первые 5 и последние 5 нуклеотидов в последовательности арРНК соответственно модифицированы путем 2'-О-метиличования, и первые 5 и последние 5 межнуклеотидных связей в последовательности арРНК соответственно модифицированы фосфоротиоатом;

CM148: первые 4 и последние 4 нуклеотида в последовательности арРНК соответственно модифицированы 2'-O-(2-метоксиэтилом), первые 3 и последние 4 межнуклеотидные связи в последовательности арРНК соответственно модифицированы фосфоротиоатом, и все уридины последовательности модифицированы путем 2'-O-Me;

CM149: первые 3 и последние 3 нуклеотида в последовательности арРНК соответственно модифицированы 2'-O-(2-метоксиэтилом), первые 2 и последние 3 межнуклеотидные связи в последовательности арРНК соответственно модифицированы фосфоротиоатом, и все уридины последовательности модифицированы путем 2'-O-Me;

CM150: первые 2 и последние 2 нуклеотида в последовательности арРНК соответственно модифицированы 2'-O-(2-метоксиэтилом), первая 1 и последние 2 межнуклеотидные связи в последовательности арРНК соответственно модифицированы фосфоротиоатом, и все уридины последовательности модифицированы путем 2'-O-Me;

CM151: первые 4 и последние 4 нуклеотида в последовательности арРНК соответственно модифицированы путем LNA модификации, первые 3 и последние 4 межнуклеотидные связи в последовательности арРНК соответственно модифицированы фосфоротиоатом, и все уридины последовательности модифицированы путем 2'-O-Me;

CM152: первые 3 и последние 3 нуклеотида в последовательности арРНК соответственно модифицированы путем LNA модификации, первые 2 и последние 3 межнуклеотидные связи в последовательности арРНК соответственно модифицированы фосфоротиоатом, и все уридины последовательности модифицированы путем 2'-O-Me;

CM153: первые 2 и последние 2 нуклеотида в последовательности арРНК соответственно модифицированы путем LNA модификации, первые 2 и последние 3 межнуклеотидные связи в последовательности арРНК соответственно модифицированы фосфоротиоатом, и все уридины последовательности модифицированы путем 2'-O-Me;

CM94: первые 3 и последние 3 нуклеотида в последовательности арРНК, все уридины и все цитидины за исключением тех, которые находятся в нацеливающем триплете, в последовательности арРНК модифицированы путем 2'-O-метилирования; все из первых 4 и последних 3 межнуклеотидных связей в последовательности арРНК модифицированы фосфоротиоатом; и каждая вторая межнуклеотидная связь от 4-ой межнуклеотидной связи с 5'-конца до 3-ей межнуклеотидной связи с 3'-конца

модифицирована фосфоротиоатом, за исключением того, что 5'-ближайшая межнуклеотидная связь каждого нуклеотида в нацеливающем триplete не является модифицированной фосфоротиоатом;

СМ119: первые 3 и последние 3 нуклеотида в последовательности арРНК, все уридины и все цитидины в последовательности арРНК за исключением тех, которые находятся в нацеливающем триplete, модифицированы путем 2'-О-метилирования; все из первых 4 и последних 3 межнуклеотидных связей в последовательности арРНК модифицированы фосфоротиоатом; каждая вторая межнуклеотидная связь от 4-ой межнуклеотидной связи с 5'-конца до 3'-ближайшей межнуклеотидной связи нацеливающего нуклеотида и от 3-ей межнуклеотидной связи с 3'-конца до 3'-ближайшего нуклеотида нацеливающего нуклеотида модифицирована фосфоротиоатом; и нацеливающий нуклеотид заменен дезоксирибонуклеотидом;

СМ120: первые 3 и последние 3 нуклеотида в последовательности арРНК, все уридины и все цитидины в последовательности арРНК за исключением тех, которые находятся в нацеливающем триplete, модифицированы путем 2'-О-метилирования; первые 4 и последние 3 межнуклеотидные связи в последовательности арРНК модифицированы фосфоротиоатом; каждая вторая межнуклеотидная связь от 4-ой межнуклеотидной связи с 5'-конца до 5'-ближайшей межнуклеотидной связи нацеливающего нуклеотида и от 3-ей межнуклеотидной связи с 3'-конца до 3'-ближайшей межнуклеотидной связи нацеливающего нуклеотида модифицирована фосфоротиоатом; и нацеливающий нуклеотид заменен дезоксирибонуклеотидом;

СМ123: первые 3 и последние 3 нуклеотида в последовательности арРНК, все уридины и все цитидины в последовательности арРНК за исключением тех, которые находятся в нацеливающем триplete, модифицированы путем 2'-О-метилирования; первые 4 и последние 3 межнуклеотидные связи модифицированы фосфоротиоатом; каждая вторая межнуклеотидная связь от 4-ой межнуклеотидной связи с 5'-конца до 3'-ближайшей межнуклеотидной связи нацеливающего нуклеотида и от 3-ей межнуклеотидной связи с 3'-конца до 3'-ближайшего нуклеотида нацеливающего нуклеотида модифицирована фосфоротиоатом; и каждый нуклеотид в нацеливающем триplete заменен дезоксирибонуклеотидом;

CM125: первые 3 и последние 3 нуклеотида в последовательности арРНК, все уридины и все цитидины в последовательности арРНК за исключением тех, которые находятся в нацеливающем триплете, модифицированы путем 2'-О-метиляции; первые 4 и последние 3 межнуклеотидные связи и 3'-ближайшие нуклеотидные связи нацеливающего нуклеотида модифицированы фосфоротиоатом; каждая вторая межнуклеотидная связь от 4-ой межнуклеотидной связи с 5'-конца до 5'-ближайшего нуклеотида из 5'-ближайшего нуклеотида нацеливающего нуклеотида и от 3-ей межнуклеотидной связи с 3'-конца до 3'-ближайшего нуклеотида нацеливающего нуклеотида модифицирована фосфоротиоатом; и каждый нуклеотид в нацеливающем триплете заменен дезоксирибонуклеотидом.

20. Способ по любому из пп. 1-19, где сайт мутации гуанозина (G) в аденозин (A), на который нацелена арРНК, представляет собой сайт мутации в NM_000203.4(IDUA)-с.1205G>A (p.Trp402Ter) или соответствующий ему сайт мутации в геноме пациента с синдромом Гурлера.

21. Способ по любому из пп. 1-20, где арРНК содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из:

1)Gm* Am*Cm-G*Cm-Cm*Cm-A*Cm-Cm*G-Um*G-Um*G-G*Um-Um*G-Cm*Um-G*Um-Cm*Um-Cm*Cm-A*G-G*A-Cm*G-G*Um-Cm*G-G*Um-Cm*Cm-Cm*G-G*Cm-Cm*Um-G*Cm-Cm*Um-G*Cm-G*Cm-G*A-Cm*A-Cm*A-Cm*Um-Um*Um*G-G-Cm-C-C-A*G-A*G-Cm*Um-G*Cm-Um*Um*Um*Um*Um*Am (SEQ ID NO: 31);

2)Gm* Am*Cm-G*Cm-Cm*Cm-A*-Cm-Cm*G-Um*G-Um*G-G*Um-Um*G-Cm*Um-G*Um-Cm*CM-A*G-G*A-Cm*G-G-G*Um-Cm*G*G*Um-Cm*Um-Cm*G-G*Um-Cm*Um-G*Cm*Um-G*G*-A-Cm*A-Cm*A-Cm*Um-Um*Um*G-G-Cm*Cd-Cd*Ad*-G-A*G-Cm*Um-G*Um*Um*Um*Um*Am (SEQ ID NO: 31);

3)Gm* Am*Cm-G*Cm-Cm*Cm-A*Cm-Cm*G-Um*G-Um*G-G*Um-Um*G-G*Um-Um*G-Cm*Um-G*Um-Cm*Um-Cm*A*G-G*A-Cm*-G-G*Um-Cm*-Cm*-G*Um-Cm*G-G*Um-Cm*Um-G*G-Cm*Um-G*-Cm*Um-G*-Cm-G*A-Cm*A-Cm*A-Cm*Um-Um*Um*G-G-Cm-Cd-Cd*Ad*G-A*G-Cm*Um-G*Um*Um*Um*Um*Am (SEQ ID NO: 31);

4)Gmoe* Amoe* Cmoe* Gmoe-C-C-C-A-C-C-C-G-Um-G-Um-G-G-Um-Um-G-C-Um-G-Um-C-C-A-G-G-G-Um-G-Um-C-C-A-G-G-G-A-G-A-C-G-G-G-Um-C-C-G-Gm-G-C-C-C-A-G

-A-G-C-Um-G-C-Um-C*Сное*Umое*Сное*Amое (SEQ ID NO: 31) или

5)G+*A+*C+*G+C-C-C-A-C-C-C-G-Um-G-Um-G-G-Um-Um-G-C-Um-G-Um-C-C-A-G-G-A-G-G-A-A-G-G-A-C-C-G-G-Um-G A-G-C-Um-G-C-Um-C*С+*U+*C+*A+ (SEQ ID NO: 31).

22. Способ по любому из пп. 1-21, где арРНК вводят в клетки способом, выбранным из группы, состоящей из: электропорации, трансфекции липосом, доставки экзосом или доставки липидных наночастиц (LNP).

23. Способ по любому из пп. 1-22, где количество арРНК при однократном введении в клетки составляет 5 нМ или больше, предпочтительно больше или равно 10 нМ, дополнительно предпочтительно больше или равно 20 нМ; в некоторых конкретных вариантах осуществления количество арРНК при однократном введении в клетки составляет от 5 до 160 нМ, например, от 10 до 160 нМ, от 20 до 160 нМ, от 40 до 160 нМ, от 20 до 80 нМ, от 40 до 80 нМ или от 20 до 40 нМ; в некоторых конкретных вариантах осуществления количество арРНК при однократном введении в клетки составляет 15 нМ, 17 нМ, 19 нМ, 21 нМ, 22 нМ, 23 нМ, 24 нМ, 25 нМ, 26 нМ, 27 нМ, 28 нМ, 29 нМ, 30 нМ, 31 нМ, 32 нМ, 33 нМ, 34 нМ, 35 нМ, 36 нМ, 37 нМ, 38 нМ, 39 нМ, 41 нМ, 43 нМ, 45 нМ, 55 нМ, 65 нМ, 75 нМ, 85 нМ, 95 нМ, 105 нМ, 115 нМ, 125 нМ, 135 нМ, 145 нМ или 155 нМ.

24. Способ по любому из пп. 1-23, где для введения арРНК в клетки осуществляют несколько введений, и интервал между двумя ближайшими введениями составляет 21 день или менее, например, больше или равно 17 дней, больше или равно 14 дней, больше или равно 12 дней, больше или равно 11 дней или больше или равно 10 дней; в некоторых вариантах осуществления интервал между двумя ближайшими введениями составляет от 9 до 20 дней, от 9 до 16 дней, от 9 до 14 дней, от 12 до 19 дней, от 12 до 15 дней или от 12 до 13 дней; в некоторых вариантах осуществления интервал между двумя ближайшими введениями составляет 7 дней, 8 дней, 11 дней, 15 дней, 18 дней, 19 дней или 20 дней.

25. Способ предотвращения или лечения синдрома Гурлера, включающий коррекцию патогенной мутации G>A синдрома Гурлера с использованием способа по любому из пп. 1-24.

26. Сконструированная арРНК, которая используется для направленного

редактирования целевой РНК в клетке на основе технологии LEAPER, где целевая РНК содержит последовательность транскрипта гена IDUA, содержащую сайт мутации гуанозина (G) в аденозин (A) (целевой аденозин), арРНК содержит комплементарную последовательность РНК, которая гибридизуется с целевой РНК, и арРНК путем гибридизации с целевой РНК способна рекрутировать аденозиндезаминазу, действующую на РНК (ADAR), которая дезаминирует целевой аденозин в целевой РНК, причем сайт мутации гуанозина (G) в аденозин (A), на который нацелена арРНК, представляет собой сайт мутации NM_000203.4(IDUA)-c.1205G>A (p.Trp402Ter) или соответствующий ему сайт мутации в геноме пациента с синдромом Гурлера.

27. АрРНК по п. 26, где нуклеотид, который расположен напротив целевого аденозина (нацеливающий нуклеотид), представляет собой цитидин (C), аденозин (A) или уридин (U).

28. АрРНК по п. 27, где нацеливающий аденозин образует нацеливающий триплет вместе со своим 5'-ближайшим нуклеотидом и 3'-ближайшим нуклеотидом, и нацеливающий триплет представляет собой 5'-ССА-3'.

29. АрРНК по любому из пп. 26-28, где арРНК представляет собой арРНК, имеющую характеристику длины, выбранную из группы, состоящей из:

55nt-c-35nt, 55nt-c-25nt, 55nt-c-24nt, 55nt-c-21nt, 55nt-c-20nt, 55nt-c-19nt, 55nt-c-18nt, 55nt-c-17nt, 55nt-c-16nt, 55nt-c-15nt, 55nt-c-14nt, 55nt-c-13nt, 55nt-c-12nt, 55nt-c-11nt, 55nt-c-10nt, 55nt-c-9nt, 50nt-c-20nt, 50nt-c-15nt, 45nt-c-55nt или 45nt-20nt,

где цитидин представляет собой нацеливающий нуклеотид в арРНК, который расположен напротив целевого аденозина, и ориентация арРНК представляет собой от 5' к 3'.

30. АрРНК по любому из пп. 26-29, где арРНК содержит одну или более химических модификаций.

31. АрРНК по любому из пп. 26-30, где химическая модификация представляет собой одну или более из группы, состоящей из:

модификации путем 2'-О-метилирования, модификации фосфоротиоатом, модификации путем дезоксирибонуклеотидной замены, LNA модификации и 2'-О-(2-метоксиэтиловой) модификации.

32. АрРНК по любому из пп. 26-31, где химическая модификация представляет собой одну или более из группы, состоящей из:

- 1) модификаций путем 2'-О-метилирования в первых 2, 3, 4 или 5 нуклеотидах;
- 2) модификаций путем 2'-О-метилирования в последних 2, 3, 4, или 5 нуклеотидах;
- 3) модификаций путем 2'-О-метилирования во всех цитидинах за исключением тех, которые находятся в нацеливающем триplete;
- 4) 2'-О-(2-метоксиэтиловых) модификаций в первых 2, 3 или 4 нуклеотидах;
- 5) 2'-О-(2-метоксиэтиловых) модификаций в последних 2, 3 или 4 нуклеотидах;
- 6) модификаций путем дезоксирибонуклеотидной замены первых 2, 3 или 4 нуклеотидов;
- 7) модификаций путем дезоксирибонуклеотидной замены последних 2, 3 или 4 нуклеотидов;
- 8) модификаций фосфоротиоатом в первых 1, 2, 3, 4 или 5 межнуклеотидных связях;
- 9) модификаций фосфоротиоатом в последних 1, 2, 3, 4 или 5 межнуклеотидных связях;
- 10) модификаций фосфоротиоатом во всех межнуклеотидных связях за исключением того, что одна или более из 5'- или 3'-ближайших межнуклеотидных связей каждого из нуклеотидов в нацеливающем триplete не являются модифицированными фосфоротиоатом; и
- 11) модификаций фосфоротиоатом в межнуклеотидных связях с интервалом в 1, 2, 3, или 4 нуклеотида за исключением того, что одна или более из 5'- или 3'-ближайших межнуклеотидных связей каждого из нуклеотидов в нацеливающем триplete не являются модифицированными фосфоротиоатом.

33. АрРНК по любому из пп. 26-32, где арРНК содержит любую химическую модификацию, выбранную из группы, состоящей из:

СМ0: первые 3 и последние 3 нуклеотида в последовательности арРНК соответственно модифицированы путем 2'-О-метилирования, и первые 3 и последние 3 межнуклеотидные связи в последовательности арРНК соответственно модифицированы фосфоротиоатом;

СМ1: первые 3 и последние 3 нуклеотида в последовательности арРНК соответственно модифицированы путем 2'-О-метиличования, первые 3 и последние 3 межнауклеотидные связи в последовательности арРНК соответственно модифицированы фосфоротиоатом и все уридины последовательности модифицированы путем 2'-О-метиличования;

СМ2: первые 3 и последние 3 нуклеотида в последовательности арРНК соответственно модифицированы путем 2'-О-метиличования, и первые 3 и последние 3 межнауклеотидные связи в последовательности арРНК соответственно модифицированы фосфоротиоатом; и 3'-ближайший нуклеотид нацеливающего нуклеотида модифицирован путем 2'-О-метиличования;

СМ3: первые 3 и последние 3 нуклеотида в последовательности арРНК соответственно модифицированы путем 2'-О-метиличования, и первые 3 и последние 3 межнауклеотидные связи в последовательности арРНК соответственно модифицированы фосфоротиоатом; и 5'-ближайший нуклеотид нацеливающего нуклеотида модифицирован путем 2'-О-метиличования;

СМ4: первые 3 и последние 3 нуклеотида в последовательности арРНК соответственно модифицированы путем 2'-О-метиличования, и первые 3 и последние 3 межнауклеотидные связи в последовательности арРНК соответственно модифицированы фосфоротиоатом; и 3'-ближайшая межнауклеотидная связь каждого из трех оснований в нацеливающем триplete соответственно модифицирована фосфоротиоатом;

СМ6: первые 5 и последние 5 нуклеотидов в последовательности арРНК соответственно модифицированы путем 2'-О-метиличования, и первые 5 и последние 5 межнауклеотидных связей в последовательности арРНК соответственно модифицированы фосфоротиоатом;

СМ148: первые 4 и последние 4 нуклеотида в последовательности арРНК соответственно модифицированы 2'-О-(2-метоксиэтилом), первые 3 и последние 4 межнауклеотидные связи в последовательности арРНК соответственно модифицированы фосфоротиоатом, и все уридины последовательности модифицированы путем 2'-О-Ме;

СМ149: первые 3 и последние 3 нуклеотида в последовательности арРНК соответственно модифицированы 2'-О-(2-метоксиэтилом), первые 2 и последние 3

межнуклеотидные связи в последовательности арРНК соответственно модифицированы фосфоротиоатом, и все уридины последовательности модифицированы путем 2'-О-Ме;

СМ150: первые 2 и последние 2 нуклеотида в последовательности арРНК соответственно модифицированы 2'-О-(2-метоксиэтилом), первая 1 и последние 2 межнуклеотидные связи в последовательности арРНК соответственно модифицированы фосфоротиоатом, и все уридины последовательности модифицированы путем 2'-О-Ме;

СМ151: первые 4 и последние 4 нуклеотида в последовательности арРНК соответственно модифицированы путем LNA модификации, первые 3 и последние 4 межнуклеотидные связи в последовательности арРНК соответственно модифицированы фосфоротиоатом, и все уридины последовательности модифицированы путем 2'-О-Ме;

СМ152: первые 3 и последние 3 нуклеотида в последовательности арРНК соответственно модифицированы путем LNA модификации, первые 2 и последние 3 межнуклеотидные связи в последовательности арРНК соответственно модифицированы фосфоротиоатом, и все уридины последовательности модифицированы путем 2'-О-Ме;

СМ153: первые 2 и последние 2 нуклеотида в последовательности арРНК соответственно модифицированы путем LNA модификации, первые 2 и последние 3 межнуклеотидные связи в последовательности арРНК соответственно модифицированы фосфоротиоатом, и все уридины последовательности модифицированы путем 2'-О-Ме;

СМ94: первые 3 и последние 3 нуклеотида в последовательности арРНК, все уридины и все цитидины за исключением тех, которые находятся в нацеливающем триплете, в последовательности арРНК модифицированы путем 2'-О-метилирования; все из первых 4 и последних 3 межнуклеотидных связей в последовательности арРНК модифицированы фосфоротиоатом; и каждая вторая межнуклеотидная связь от 4-ой межнуклеотидной связи с 5'-конца до 3-ей межнуклеотидной связи с 3'-конца модифицирована фосфоротиоатом, за исключением того, что 5'-ближайшая межнуклеотидная связь каждого нуклеотида в нацеливающем триплете не является модифицированной фосфоротиоатом;

СМ119: первые 3 и последние 3 нуклеотида в последовательности арРНК, все уридины и все цитидины в последовательности арРНК за исключением тех, которые находятся в нацеливающем триплете, модифицированы путем 2'-О-метилирования; все из

первых 4 и последних 3 межнуклеотидных связей в последовательности арРНК модифицированы фосфоротиоатом; каждая вторая межнуклеотидная связь от 4-ой межнуклеотидной связи с 5'-конца до 3'-ближайшей межнуклеотидной связи нацеливающего нуклеотида и от 3-ей межнуклеотидной связи с 3'-конца до 3'-ближайшего нуклеотида нацеливающего нуклеотида модифицирована фосфоротиоатом; и нацеливающий нуклеотид заменен дезоксирибонуклеотидом;

СМ120: первые 3 и последние 3 нуклеотида в последовательности арРНК, все уридины и все цитидины в последовательности арРНК за исключением тех, которые находятся в нацеливающем триplete, модифицированы путем 2'-О-метилирования; первые 4 и последние 3 межнуклеотидные связи в последовательности арРНК модифицированы фосфоротиоатом; каждая вторая межнуклеотидная связь от 4-ой межнуклеотидной связи с 5'-конца до 5'-ближайшей межнуклеотидной связи нацеливающего нуклеотида и от 3-ей межнуклеотидной связи с 3'-конца до 3'-ближайшей межнуклеотидной связи нацеливающего нуклеотида модифицирована фосфоротиоатом; и нацеливающий нуклеотид заменен дезоксирибонуклеотидом;

СМ123: первые 3 и последние 3 нуклеотида в последовательности арРНК, все уридины и все цитидины в последовательности арРНК за исключением тех, которые находятся в нацеливающем триplete, модифицированы путем 2'-О-метилирования; первые 4 и последние 3 межнуклеотидные связи модифицированы фосфоротиоатом; каждая вторая межнуклеотидная связь от 4-ой межнуклеотидной связи с 5'-конца до 3'-ближайшей межнуклеотидной связи нацеливающего нуклеотида и от 3-ей межнуклеотидной связи с 3'-конца до 3'-ближайшего нуклеотида нацеливающего нуклеотида модифицирована фосфоротиоатом; и каждый нуклеотид в нацеливающем триplete заменен дезоксирибонуклеотидом;

СМ125: первые 3 и последние 3 нуклеотида в последовательности арРНК, все уридины и все цитидины в последовательности арРНК за исключением тех, которые находятся в нацеливающем триplete, модифицированы путем 2'-О-метилирования; первые 4 и последние 3 межнуклеотидные связи и 3'-ближайшие нуклеотидные связи нацеливающего нуклеотида модифицированы фосфоротиоатом; каждая вторая межнуклеотидная связь от 4-ой межнуклеотидной связи с 5'-конца до 5'-ближайшего

нуклеотида из 5'-ближайшего нуклеотида нацеливающего нуклеотида и от 3-ей межнуклеотидной связи с 3'-конца до 3'-ближайшего нуклеотида нацеливающего нуклеотида модифицирована фосфорогидратом; и каждый нуклеотид в нацеливающем триплете заменен дезоксирибонуклеотидом.

34. арРНК по любому из пп. 26-33, где арРНК содержит любую последовательность, выбранную из группы, состоящей из:

1)Gm* Am*Cm*G*Cm-Cm* Cm-A* Cm-Cm*G-Um*G-Um*G-G*Um-Um*G-Cm*Um-G*Um-Cm* Cm-A*G-G* A-Cm*G-G*Um-Cm* Cm-Cm*G-G* Cm-Cm*Um-G* Cm-G* A-Cm* A-Cm*Um-Um* Cm-G*G-Cm-C-C-A*G-A*G-Cm*Um-G* Cm-Um* Cm-Cm*Um* Cm* Am (SEQ ID NO: 31);

2)Gm* Am*Cm*G*Cm-Cm* Cm-A* -Cm-Cm*G-Um*G-Um*G-G*Um-Um*G-Cm*Um-G*Um-Cm* Cm-A*G-G* A-Cm*G-G*Um-Cm* Cm-Cm*G-G* Cm-Cm*Um-G* Cm-G* -A-Cm* A-Cm*Um-Um* Cm-G*G-Cm* Cd-Cd*Ad* -G-A*G-Cm*Um-G* Cm-Um* Cm-Cm*Um* Cm* A m (SEQ ID NO: 31);

3)Gm* Am*Cm*G*Cm-Cm* Cm-A* Cm-Cm*G-Um*G-Um*G-G*Um-Um*G-Cm*Um-G*Um-Cm* Cm-A*G-G* A-Cm* -G-G*Um-Cm* Cm-Cm*G-G* Cm-Cm*Um-G* -Cm-G* A-Cm* A-Cm*Um-Um* Cm-G*G-Cm-Cd-Cd*Ad*G-A*G-Cm*Um-G* Cm-Um* Cm-Cm*Um* Cm* Am (SEQ ID NO: 31);

4)Gmoe* Amoe* Cmoe* Gmoe-C-C-C-A-C-C-G-Um-G-Um-G-G-Um-Um-G-C-Um-G-Um-C-C-A-G-G-A-C-G-G-Um-C-C-C-G-G-C-C-Um-GC-G-A-C-A-C-Um-Um-C-G-G-C-C-C-A-G-A-G-C-Um-G-C-Um-C* Cmoe*Umoe* Cmoe* Amoe (SEQ ID NO: 31) или

5)G+*A+*C+*G+C-C-C-A-C-C-G-Um-G-Um-G-G-Um-Um-G-C-Um-G-Um-C-C-A-G-G-A-C-G-G-Um-C-C-C-G-G-C-C-Um-GC-G-A-C-A-C-Um-Um-C-G-G-C-C-C-A-G-A-G-C-Um-G-C-Um-C* C+*U+*C+*A+ (SEQ ID NO: 31).

35. Конструкция, содержащая кодирующую последовательность арРНК по любому из пп. 26-29.

36. Композиция, липосома, экзосома, липидная наночастица, клетка, библиотека, продукт или набор, содержащие арРНК по любому из пп. 26-34 или конструкцию по п. 35.

37. Применение арРНК по любому из пп. 26-34, конструкции по п. 35 и композиции, липосомы, экзосомы, липидной наночастицы, клетки, библиотеки или набора по п. 36 в

получении лекарственного средства, продукта или набора для предотвращения или лечения синдрома Гурлера.

В некоторых вариантах осуществления арРНК содержит последовательность, комплементарную последовательности РНК, кодирующей IDUA, и содержит одно или более ошибочных спариваний, неоднозначных спариваний и/или односторонних выпетливаний.

В настоящей заявке арРНК может быть экспрессирована в форме Xnt-c-Ynt (в порядке от 5' к 3'-концу), где X обозначает количество нуклеотидов от нацеливающего нуклеотида (не включен) до последнего нуклеотида (включен) на 5'-конце арРНК, и Y обозначает количество нуклеотидов от нацеливающего нуклеотида (не включен) до последнего нуклеотида (включен) на 3'-конце арРНК. Например, когда арРНК представляет собой 55nt-c-35nt, это означает, что расстояние от нацеливающего нуклеотида до 5'-конца арРНК составляет 55 нуклеотидов, и расстояние от нацеливающего нуклеотида до 3'-конца арРНК составляет 35 нуклеотидов, и длина всей арРНК составляет $55 \text{ nt} + 35 \text{ nt} + 1 \text{ nt} = 91 \text{ nt}$.

В некоторых вариантах осуществления арРНК не содержит область, способную образовывать внутримолекулярную структуру типа «стебель-петля» для рекрутинга фермента ADAR. В некоторых вариантах осуществления способ направленного редактирования целевой РНК в клетке на основе технологии LEAPER не включает введение экзогенного ферментного белка ADAR в клетку. В некоторых вариантах осуществления способ направленного редактирования целевой РНК в клетке на основе технологии LEAPER включает введение экзогенного ферментного белка ADAR в клетку.

При использовании арРНК, описанной в настоящем документе, оценка на клеточном уровне показывает, что скорость восстановления сайта мутации с.1205G>A (эффективность редактирования A>G) на РНК, кодирующей ген IDUA, составляет по меньшей мере около 30 %, например, по меньшей мере около 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 % или выше.

Способ описан в настоящем документе для лечения или предотвращения синдрома Гурлера, при этом арРНК не индуцирует сильный иммунный ответ в организме.

Таким образом, в настоящей заявке предложена арРНК для лечения синдрома

Гурлера, и конструкция, композиция, клетка, библиотека или набор, содержащие арРНК, и способ предотвращения и лечения синдрома Гурлера с использованием арРНК, конструкции, композиции, клетки, библиотеки или набора. Технические решения по настоящей заявке имеют по меньшей мере следующие преимущества:

1. Не зависят от экспрессии экзогенных белков. Таким образом, отсутствует повреждение клеток из-за введения экзогенных белков; отсутствуют нецелевые эффекты из-за сверхэкспрессии экзогенных белков; отсутствует иммунный ответ в организме, вызванный экзогенными белками; отсутствует нарушение редактирования генов из-за нейтрализации эффективных экзогенных белков, вызванной ранее существовавшими антителами в организме; и отсутствует ограничение выбора векторов доставки из-за чрезмерной молекулярной массы вводимых белков.

2. Настоящая заявка раскрывает способ редактирования РНК, который, в отличие от редактирования ДНК, является обратимым и регулируемым и не повреждает геномную ДНК так, чтобы вызвать необратимое повреждение, и, следовательно, является более безопасным.

3. Техническое решение, представленное в настоящей заявке, является более эффективным в редактировании по сравнению с другими решениями для лечения, применимыми для редактирования генов *in vivo*.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

На фиг. 1 показан обнаруженный генотип IDUA (с1205 G>A) в клетках GM06214.

На фиг. 2A-2B показана конструкция арРНК для пре-мРНК и мРНК IDUA. Были протестированы функции клеток, редактируемых этими арРНК (арРНК вводятся в клетки с помощью электропорации); и была протестирована эффективность редактирования A>G сайта редактирования.

На фиг. 3A-3B показана конструкция линии IDUA-репортерных клеток (3A), и была обнаружена эффективность редактирования арРНК различной длины (симметрично усеченной) на 293T-IDUA-репортере (арРНК вводятся в клетки посредством электропорации) (3B).

На фиг. 4A-4B показана ферментативная активность и эффективность

редактирования в различные моменты времени после электропорации арРНК различной длины (симметрично усеченной) в клетках GM06214.

На фиг. 5 показана обнаруженная ферментативная активность IDUA и эффективность редактирования после трансфекции арРНК (симметрично усеченной, 3'-усеченной и 5'-усеченной) в клетки GM06214 с помощью липофектамина RNAiMAX.

На фиг. 6А-6В показаны предпочтительные арРНК от 55nt-с-25nt до 55nt-с-5nt (восстановление основания по основанию на 3'-конце), которые трансфицировали в клетки GM06214 с помощью липофектамина RNAiMAX, и предпочтительный диапазон длины 3'-конца был выбран путем обнаружения ферментативной активности. На фиг. 6А показаны результаты обнаружения арРНК от 55nt-с-25nt до 55nt-с-10nt. На фиг. 6В показана другая синтетическая партия арРНК от 55nt-с-16nt до 55nt-с-5nt, используемых в настоящем документе.

На фиг. 7 показана трансфекция арРНК с одинаковой длиной на 3'-конце (фиксированных на двух предпочтительных длинах) и различной длиной на 5'-конце (постепенное уменьшение оснований от 55nt) в клетки GM06214 с помощью липофектамина RNAiMAX, и предпочтительный диапазон длины 5'-конца был проверен на предмет обнаружения ферментативной активности. На фигуре также показано, что эффективность редактирования арРНК значительно снижается, когда она составляет менее 60 nt.

На фиг. 8 показаны ограниченные сдвиги сайтов редактирования арРНК с 3 предпочтительными длинами для получения 3 групп арРНК. арРНК в каждой группе имеют одинаковую длину и имеют разные сайты редактирования. Эти арРНК трансфицировали в клетки GM06214, соответственно, с помощью трансфекции липофектаминами RNAiMAX, и лучшую комбинацию длины и сайтов редактирования подвергали скринингу на предмет обнаружения ферментативной активности.

На фиг. 9А-9С показано сравнение эффектов модификаций CM1 и CM0 на эффективность редактирования арРНК при трех длинах арРНК (фиг. 9А) и трансфекцию арРНК с 71nt и 76nt, содержащих различные химические модификации, в клетки GM06214 с помощью липофектамина RNAiMAX, и предпочтительные химические модификации были подвергнуты скринингу для обнаружения ферментативной активности (фиг. 9В) и

обнаружения частоты мутации A>G на целевом сайте (фиг. 9C).

На фиг. 10A-10B показано тестирование градиента концентрации CM1 модифицированного 55nt-c-16nt, 55nt-c-14nt и 55nt-c-11nt. Эффекты арРНК наблюдались с точки зрения ферментативной активности (фиг. 10A) и частоты мутации на целевом сайте (фиг. 10B), соответственно.

На фиг. 11A-11B показана трансфекция арРНК в клетки GM06214 с помощью липофектамина RNAiMAX, и эффект модификации CM1 был дополнительно проверен с помощью обнаружения ферментативной активности.

На фиг. 12 показана эффективность редактирования мутации A>G в гене IDUA дикого типа в первичных клетках печени человека.

На фиг. 13 показано сравнение эффективности редактирования (представленной ферментативной активностью IDUA) транскрипта сайта мутации с.1239 G>A (p.Trp402Ter) в клетках GM06214 между способом согласно настоящей заявке и предпочтительным способом в предшествующем уровне техники.

На фиг. 14A-14B показано влияние различных типов и количеств концевых модификаций на результаты редактирования гена G>A арРНК, которые представлены в виде флуоресцентных экспрессий клеток, содержащих репортерную систему, в день 2 (фиг. 14A) и день 7 (фиг. 14B).

На фиг. 15A-15C показано влияние комбинаций различных количеств и различных сайтов оснований с модификацией фосфоротиоатом, модификацией путем 2'-O-Me и модификацией путем дезоксирибонуклеотидной замены на результаты редактирования гена G>A арРНК, которые представлены в виде флуоресцентных экспрессий в клетках, содержащих репортерную систему, на день 3 (фиг. 15A), день 5 (фиг. 15B) и день 7 (фиг. 15C).

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ЗАЯВКИ

Определения

Настоящая заявка будет описана в данном документе с помощью примеров и ссылкой на графические материалы, но настоящая заявка не ограничивается ими, а определяется только формулой изобретения. Любые прилагаемые ссылочные маркировки

на графические материалы в формуле изобретения не должны толковаться как ограничивающие объем изобретения. Когда термин «содержать/включать» или «содержащий/включающий» используется в описании и формуле изобретения, они не исключают другие компоненты, элементы или стадии. Когда в данном документе используется числовой диапазон нуклеотидов, значения двух конечных точек диапазона и все целые числа между двумя конечными точками включены. Например, для диапазона 60-200 нуклеотидов, любое целое число нуклеотидов между 60 и 200 нуклеотидами охватывается в дополнение к числам 60 нуклеотидов и 200 нуклеотидов.

Следующие термины или определения приведены только для облегчения понимания настоящей заявки. Если специально не определено в настоящем документе, все термины, используемые в настоящем документе, имеют такое же значение, что и термины, используемые специалистами в данной области техники. Практикующие специалисты могут обратиться к книгам, например, *Molecular Cloning: a Laboratory Manual (Fourth Edition)*, (Март 2017, опубликована Science Press, LLC, авторы J. Sambrook, M.R. Green и переводчик Fuchu He) для понимания определений и терминов в данной области. Определения, приведенные в данном документе, не следует толковать как имеющие объем, меньший, чем объем, понятный специалистам в данной области техники.

В данном контексте термин «целевой сайт» относится к нуклеотидному сайту в последовательности РНК, который подлежит редактированию.

Термин «дРНК» (РНК, рекрутирующая дезаминазу) относится к сконструированной РНК, способной рекрутировать дезаминазу, например, аденозиндезаминазу, действующую на РНК (ADAR), для дезаминирования целевого аденозина. Она также называется «арРНК» (РНК, рекрутирующая аденозиндезаминазу) из-за своей функции рекрутирования аденозиндезаминазы. В настоящей заявке дРНК и арРНК используются взаимозаменяемо для обозначения одного и того же значения. Например, в контексте настоящей заявки арРНК связывается с сегментом РНК в клетке посредством комплементарного спаривания оснований и рекрутирует дезаминазу, например, ADAR, для дезаминирования целевого нуклеотида, например, аденозина (A), расположенного в целевом сайте этой последовательности РНК, например, в инозин, тем самым обеспечивая возможность редактирования. В частности, когда целевой нуклеотид представляет собой

аденозин, целевой нуклеотид также называют «целевым аденозином» или «целевым А». РНК, содержащая целевой нуклеотид, называется «целевая РНК» или «РНК-мишень», и последовательность, содержащая целевой нуклеотид в целевой РНК, называется «целевой последовательностью» или «последовательностью-мишенью».

В настоящей заявке, когда используемая арРНК связывается и гибридизуется с целевой РНК, один нуклеотид в последовательности арРНК расположен непосредственно напротив целевого аденозина, подлежащего редактированию в целевой РНК. Этот нуклеотид в последовательности арРНК может представлять собой цитидин (С), аденозин (А) или уридин (U). Цитидин (С), аденозин (А) и уридин (U), которые расположены напротив целевого аденозина, совместно называются «нацеливающим нуклеотидом» или, соответственно, «нацеливающим цитидином (С)», «нацеливающим аденозином (А)» и «нацеливающим уридином (U)».

В настоящей заявке все последовательности нуклеиновых кислот записаны в порядке от 5' к 3'-концу. Следовательно, когда для описания последовательности в данном документе используются признаки «первый» и «последний», они обозначают «5'-конец» и «3'-конец» последовательности, соответственно. В частности, нуклеотид, ближайший к любому нуклеотиду в направлении его 5'-конца, называется «5'-ближайшим нуклеотидом» или «5'-ближайшим нуклеозидом» нуклеотида; нуклеотид, ближайший к любому нуклеотиду в направлении его 3'-конца, называется «3'-ближайшим нуклеотидом» или «3'-ближайшим нуклеозидом» нуклеотида. Связь между любым из нуклеотидов и его 5'-ближайшим нуклеотидом называется «5'-ближайшей межнауклеотидной связью»; связь между любым из нуклеотидов и его 3'-ближайшим нуклеотидом называется «3'-ближайшей межнауклеотидной связью». Например, ближайшие нуклеотиды в 5'- и 3'-концевых направлениях целевого нуклеотида в целевой РНК называют «5'-ближайшим нуклеотидом целевого нуклеотида» и «3'-ближайшим нуклеотидом целевого нуклеотида», соответственно; и нуклеотидный триплет, образованный путем связывания целевого нуклеотида и его 5'-ближайшего нуклеотида и 3'-ближайшего нуклеотида, называют «целевым триплетом». Аналогично, ближайшие нуклеотиды в 5'- и 3'-концевых направлениях нацеливающего нуклеотида называются «5'-ближайшим нуклеотидом нацеливающего нуклеотида» и «3'-ближайшим нуклеотидом нацеливающего нуклеотида»

соответственно; и нуклеотидный триплет, образованный путем связывания нацеливающего нуклеотида и его 5'-ближайшего нуклеотида и 3'-ближайшего нуклеотида, называется «нацеливающим триплетом».

Термины «полинуклеотид», «нуклеотидная последовательность» и «нуклеиновая кислота» используются взаимозаменяемо. Они относятся к полимерным формам нуклеотидов любой длины, т.е. полимерным формам дезоксирибонуклеотидов (ДНК) или рибонуклеотидов (РНК) или их аналогов. Дезоксирибонуклеотид или рибонуклеотид может называться «нуклеотидом» или «нуклеозидом». В настоящей заявке, если не указано иное, термины «нуклеотид» и «нуклеозид» используются взаимозаменяемо. Нуклеотиды связаны друг с другом фосфодиэфирными связями. Множество нуклеотидов связаны фосфодиэфирными связями с образованием полинуклеотида или нуклеиновой кислоты. Фосфодиэфирные связи между нуклеотидами могут быть фосфортированы с заменой кислорода, связанного двойной связью, в фосфодиэфирной связи на серу, связанную двойной связью, с образованием «фосфоротиоатной связи», и этот процесс известен как «модификация фосфоротиоатом».

В настоящей заявке «2'-О-Ме» или «2'-ОМе», то есть 2'-О'-метил, относится к группе, образованной путем замены атома водорода на второй гидроксильной группе на рибозе нуклеотида на метильную группу. И этот процесс метильной замены называется «2'-О-метилением», «модификацией путем 2'-О-метилирования», «модификация путем 2'-ОМе» или «модификация путем 2'-О-Ме». В данном контексте термин «LNA» или «блокированная нуклеиновая кислота» относится к конкретному бициклическому нуклеотидному производному, в котором рибоза 2' и 4' образует оксиметиленовый мостик (циклическую структуру) путем конденсации. Таким образом, термин «модификация на основе блокированной нуклеиновой кислоты» или «LNA модификация» в данной заявке означает, что нуклеотид модифицирован так, чтобы представлять собой блокированную нуклеиновую кислоту.

В данном контексте модификация путем «дезоксирибонуклеотидной замены» относится к замене рибонуклеотида в РНК соответствующим ему дезоксирибонуклеотидом.

Термин «2'-О-(2-метоксиэтил)» относится к группе, образованной путем замещения

атома водорода во второй гидроксильной группе на рибозе модифицированного нуклеотида 2-метоксиэтилом, и этот процесс замещения 2-метоксиэтилом называется 2'-O-(2-метоксиэтиловой) модификацией.

В настоящем документе, когда присутствует в последовательности нуклеиновой кислоты, «*» обозначает межнуклеотидную связь, модифицированную фосфоротиоатом, «m» обозначает, что нуклеотид непосредственно слева от него является модифицированным путем 2'-O-метилирования, и «moe» обозначает, что нуклеотид непосредственно слева от него является модифицированным 2'-O-(2-метоксиэтилом), «+» обозначает, что нуклеотид непосредственно слева от него является модифицированным путем LNA модификации, «d» обозначает, что нуклеотид непосредственно слева от него заменен дезоксирибонуклеотидом. В настоящей заявке, когда между двумя буквами, представляющими нуклеотиды, нуклеозиды или основания, используется «>», то это обозначает мутацию, в которой нуклеотид, представленный буквой слева от него, модифицирован так, чтобы представлять собой нуклеотид, представленный буквой справа от него. Например, «G>A» обозначает мутацию гуанозина в аденозин.

«Комплементация» в данном документе относится к образованию водородных связей между нуклеиновой кислотой и другой нуклеиновой кислотой посредством традиционного принципа спаривания оснований по Уотсону-Крику. В данном контексте комплементация может относиться к тому, что большинство нуклеотидов двух нуклеиновых кислот комплементарны друг другу, и не требует комплементарности всех их нуклеотидов.

«Редактирование РНК» относится к естественному процессу, присутствующему в эукариотических клетках, где редактирование основания А (аденозин) в I (инозин) происходит на уровне РНК после транскрипции ДНК и перед трансляцией белка, и во время трансляции инозин распознается как G (гуанозин), что приводит к переходу A>G. Это редактирование может происходить путем дезаминирования А до формы I, катализируемого протеазой ADAR (аденозиндезаминаза, действующая на РНК), в конечном итоге вызывая направленное редактирование одного нуклеотида. Редактирование может происходить в кодирующих областях, включая последовательности интронов и экзонов, а также в последовательностях некодирующих областей, и

редактирование кодирующих областей может переопределять кодирующие последовательности белка.

В данном контексте термин «конструкция» относится к нуклеиновой кислоте, содержащей кодирующую последовательность РНК или кодирующую последовательность аминокислоты, где кодирующая последовательность может экспрессировать РНК или аминокислоту посредством транскрипции или трансляции. Конструкция может быть циклической или линейной, может быть двухцепочечной или одноцепочечной, может представлять собой ДНК или РНК, или гибридную молекулу ДНК и РНК, и может быть химически синтезирована или биосинтезирована. В некоторых конкретных вариантах осуществления конструкция представляет собой плазмиду. В некоторых конкретных вариантах осуществления конструкция представляет собой олигонуклеотид.

В данном контексте термин «вводить» или «введение» в клетку относится к процессу обеспечения прохождения белка или нуклеиновой кислоты, кодирующей белок, РНК или конструкции, кодирующей РНК, плазмиды или другой линейной или циклической ДНК и т.д. через клеточную мембрану и вхождения в клетку путем трансфекции, инфекции, эндоцитоза и т.д.

Для решения существующей проблемы, связанной с отсутствием надежных методов лечения синдрома Гурлера, в настоящей заявке на основании индивидуализированных признаков синдрома Гурлера выбирают мутантный тип (NM_000203.4(IDUA)-c.1205G>A (p.Trp402Ter)) с наибольшим процентом генов, вызывающих IDUA, и на основе технологии LEAPER оптимизируют длину арРНК и положение нацеливающего основания и одновременно вводят соответствующие химические модификации для разработки функциональной РНК согласно настоящей заявке, т.е. арРНК, и способов ее применения для лечения синдрома Гурлера. АрРНК может нацеливать и связывать последовательности РНК, кодирующие α -L-идуронидазу (IDUA), содержащие сайты мутации G>A, путем комплементарного спаривания оснований последовательностей, рекрутируя дезаминазу для дезаминирования аденозина (A) (целевого аденозина) сайта мутации с образованием инозина (I), который будет распознан как G (гуанозин) во время трансляции, тем самым реализуя трансляцию A>G. Преждевременный стоп-кодон, который появляется из-за мутации UGG>UAG в пре-мРНК или мРНК, транскрибируемой из гена IDUA, может быть

возвращен к кодону UGG, кодирующему триптофан, путем использования арРНК и способа в соответствии с настоящей заявкой, что позволяет продолжить синтез фермента IDUA и восстановить функцию фермента IDUA.

Путем конструирования репортерной системы с патогенной мутацией IDUA (с.1205G>A) при использовании клеток GM06214, приобретенных у Института Кориелла (фибробласты, полученные от пациента с синдромом Гурлера (TGG>TAG [Trp402Ter (W402X)] гомозиготная мутация в положении 1293 гена IDUA в экзоне 9), и при использовании клеток GM01323 (фибробласты, полученные от пациента с болезнью Шейе, содержащие переход G>A (IVS5AS-7G>A) в положении -7 экзона 6, то есть, интрона 5) в качестве контроля, оценивали функцию и характеристики арРНК согласно настоящей заявке. Оценка включает трансфекцию арРНК в клетки, содержащие вышеупомянутую репортерную систему, или клетки GM06214, и эффективность редактирования арРНК тестировали путем сравнения интенсивности флуоресценции репортерной системы, функции фермента IDUA или путем обнаружения эффективности редактирования A>G или частоты мутации с помощью таких способов, как NGS (технология секвенирования второго поколения).

Способ редактирования РНК

В одном аспекте настоящего изобретения предложен способ направленного редактирования целевой РНК в клетке на основе технологии LEAPER, где целевая РНК содержит последовательность транскрипта гена IDUA, содержащую сайт мутации гуанозина (G) в аденозин (A) (целевой аденозин). Способ включает: введение в клетку арРНК или конструкции, содержащей кодирующую последовательность арРНК, где арРНК содержит комплементарную последовательность РНК, которая гибридизуется с целевой РНК, и где арРНК путем гибридизации с целевой РНК способна рекрутировать аденозиндезаминазу, действующую на РНК (ADAR), которая дезаминирует целевой аденозин в целевой РНК.

В некоторых вариантах осуществления 5'-ближайший нуклеотид целевого аденозина в целевой РНК представляет собой нуклеотид, выбранный из U, C, A и G, и порядок предпочтения представляет собой $U>C \approx A>G$; и 3'-ближайший нуклеотид

целевого аденозина в целевой РНК представляет собой нуклеотид, выбранный из G, C, A и U, и порядок предпочтения представляет собой $G > C > A \approx U$. В некоторых вариантах осуществления в целевой РНК целевой аденозин расположен в целевом триplete, выбранном из группы, состоящей из: UAG, UAC, UAA, UAU, CAG, CAC, CAA, CAU, AAG, AAC, AAA, AAU, GAG, GAC, GAA и GAU. В некоторых вариантах осуществления целевой триплет, образованный целевым аденозином вместе с его 5'-ближайшим нуклеотидом и 3'-ближайшим нуклеотидом, представляет собой 5'-UAG-3'. В некоторых вариантах осуществления целевая РНК выбрана из: пре-мРНК или мРНК, транскрибируемой из гена IDUA. В некоторых вариантах осуществления целевая РНК представляет собой пре-мРНК, транскрибируемую из гена IDUA.

В некоторых вариантах осуществления арРНК содержит одно или более ошибочных спариваний, неоднозначных спариваний и/или односторонних выпетливаний с комплементарными последовательностями РНК, кодирующими IDUA. В некоторых вариантах осуществления арРНК не содержит область, способную образовывать внутримолекулярную структуру типа «стебель-петля» для рекрутинга фермента ADAR.

В некоторых вариантах осуществления нуклеотид в арРНК, который расположен напротив целевого аденозина, (нацеливающий нуклеотид) представляет собой цитидин (C), аденозин (A) или уридин (U), предпочтительно C. В некоторых вариантах осуществления 5'-ближайший нуклеотид нацеливающего аденозина представляет собой C, G или U. В некоторых вариантах осуществления 3'-ближайший нуклеотид нацеливающего аденозина представляет собой A. В некоторых вариантах осуществления нацеливающий триплет образован нацеливающим нуклеотидом вместе с его 5'-ближайшим нуклеотидом и 3'-ближайшим нуклеотидом, где нацеливающий триплет представляет собой 5'-ССА-3'.

В некоторых вариантах осуществления длина арРНК составляет более 61 nt, например, длина арРНК составляет от 62 до 121 nt, от 62 до 111 nt, от 62 до 101 nt, от 62 до 100 nt, от 62 до 91 nt, от 62 до 76 nt или от 62 до 70 nt; в некоторых вариантах осуществления длина арРНК выбрана из любого целого числа нуклеотидов от 62 до 121 nt; в некоторых конкретных вариантах осуществления длина арРНК составляет 62 nt, 63 nt, 64 nt, 65 nt, 66 nt, 67 nt, 68 nt, 69 nt, 70 nt, 71 nt, 72 nt, 73 nt, 74 nt, 75 nt, 76 nt, 77 nt, 78 nt, 79 nt, 80 nt, 81 nt, 82 nt, 83 nt, 84 nt, 85 nt, 86 nt, 87 nt, 88 nt, 89 nt, 90 nt, 92 nt, 95 nt,

98 nt, 100 nt, 103 nt или 106 nt.

В некоторых вариантах осуществления расстояние от нацеливающего нуклеотида арРНК до 3'-конца арРНК меньше, чем расстояние от нацеливающего нуклеотида до 5'-конца арРНК. В некоторых вариантах осуществления расстояние от нацеливающего нуклеотида арРНК до ее 3'-конца составляет более 8 nt, например, от 9 до 60 nt, предпочтительно от 9 до 45 nt или от 9 до 35 nt; в некоторых вариантах осуществления, чтобы избежать сверхдлинных поли G-структур, где это возможно, расстояние от нацеливающего нуклеотида арРНК до ее 3'-конца выбрано из от 9 до 25 nt, от 9 до 26 nt или от 9 до 27 nt; предпочтительно в некоторых вариантах осуществления расстояние от нацеливающего нуклеотида арРНК до ее 3'-конца выбрано из от 9 до 20 nt, от 9 до 21 nt или от 9 до 22 nt; в некоторых конкретных вариантах осуществления расстояние от нацеливающего нуклеотида арРНК до ее 3'-конца представляет собой любое целое число нуклеотидов, выбранное из от 9 до 25 nt, например, 10 nt, 11 nt, 12 nt, 13 nt, 14 nt, 15 nt, 16 nt, 17 nt, 18 nt, 19 nt, 23 nt или 24 nt. В некоторых вариантах осуществления расстояние от нацеливающего нуклеотида арРНК до ее 5'-конца составляет более 25 nt, например, от 26 до 60 nt, от 35 до 60 nt или от 45 до 60 nt; в некоторых предпочтительных вариантах осуществления расстояние от нацеливающего нуклеотида арРНК до ее 5'-конца выбрано из группы, состоящей из: 45 nt, 45 nt, 46 nt, 47 nt, 48 nt, 49 nt, 50 nt, 51 nt, 52 nt, 53 nt, 54 nt, 55 nt, 56 nt, 57 nt, 58 nt или 59 nt.

В некоторых вариантах осуществления расстояние от нацеливающего нуклеотида арРНК до 5'-конца арРНК меньше, чем расстояние от нацеливающего нуклеотида до 3'-конца арРНК. В некоторых вариантах осуществления расстояние от нацеливающего нуклеотида арРНК до 5'-конца арРНК составляет более 35 nt, например, от 36 до 60 nt или от 36 до 55 nt; предпочтительно расстояние от нацеливающего нуклеотида арРНК до 5'-конца арРНК выбрано из группы, состоящей из: 54 nt, 53 nt, 52 nt, 51 nt, 50 nt, 49 nt, 48 nt, 47 nt, 46 nt, 45 nt, 44 nt, 43 nt, 42 nt, 41 nt, 40 nt, 39 nt, 38 nt или 36 nt.

В некоторых вариантах осуществления арРНК представляет собой арРНК, имеющую характеристику длины, выбранную из группы, состоящей из: 55nt-c-35nt, 55nt-c-25nt, 55nt-c-24nt, 55nt-c-21nt, 55nt-c-20nt, 55nt-c-19nt, 55nt-c-18nt, 55nt-c-17nt, 55nt-c-16nt, 55nt-c-15nt, 55nt-c-14nt, 55nt-c-13nt, 55nt-c-12nt, 55nt-c-11nt, 55nt-c-10nt,

55nt-c-9nt, 50nt-c-20nt, 50nt-c-15nt, 45nt-c-55nt или 45nt-c-20nt. Предпочтительно арРНК представляет собой арРНК, имеющую характеристику длины, выбранную из группы, состоящей из: 55nt-c-20nt, 55nt-c-15nt или 55nt-c-14nt.

В некоторых вариантах осуществления арРНК представляет собой олигонуклеотид. В некоторых вариантах осуществления арРНК содержит одну или более химических модификаций. Специалистам в данной области техники должно быть известно, что некоторые подходящие химические модификации могут повысить эффективность редактирования арРНК путем улучшения стабильности РНК в клетке или *in vivo* при обеспечении эффективности редактирования, например, добавление модификаций путем 2'-О-метилирования к нуклеотидам на обоих концах РНК или обеспечения того, чтобы межнуклеотидная связь подвергалась модификациям фосфоротиоатом. Как можно видеть из вариантов осуществления настоящей заявки, стабильность арРНК и эффективность редактирования последовательностей арРНК согласно настоящей заявке могут быть улучшены одной или более химическими модификациями, выбранными из: модификации путем 2'-О-метилирования, модификации фосфоротиоатом, модификации путем дезоксирибонуклеотидной замены, LNA модификации и 2'-О-(2-метоксиэтиловой) модификации. В частности, в некоторых вариантах осуществления химические модификации представляют собой одну или более модификаций, выбранных из группы, состоящей из:

- 1) модификаций путем 2'-О-метилирования в первых 2, 3, 4 или 5 нуклеотидах;
- 2) модификаций путем 2'-О-метилирования в последних 2, 3, 4, или 5 нуклеотидах;
- 3) модификаций путем 2'-О-метилирования во всех цитидинах за исключением тех, которые находятся в нацеливающем триplete;
- 4) 2'-О-(2-метоксиэтиловых) модификаций в первых 2, 3 или 4 нуклеотидах;
- 5) 2'-О-(2-метоксиэтиловых) модификаций в последних 2, 3 или 4 нуклеотидах;
- 6) модификаций путем дезоксирибонуклеотидной замены первых 2, 3 или 4 нуклеотидов;
- 7) модификаций путем дезоксирибонуклеотидной замены последних 2, 3 или 4 нуклеотидов;
- 8) модификаций фосфоротиоатом в первых 1, 2, 3, 4 или 5 межнуклеотидных связях;

9) модификаций фосфоротиоатом в последних 1, 2, 3, 4 или 5 межнуклеотидных связях;

10) модификаций фосфоротиоатом во всех межнуклеотидных связях за исключением того, что одна или более из 5'- или 3'-ближайших межнуклеотидных связей каждого из нуклеотидов в нацеливающем триплете не являются модифицированными фосфоротиоатом; и

11) модификаций фосфоротиоатом в межнуклеотидных связях с интервалом в 1, 2, 3 или 4 нуклеотида за исключением того, что одна или более из 5'- или 3'-ближайших межнуклеотидных связей каждого из нуклеотидов в нацеливающем триплете не являются модифицированными фосфоротиоатом.

Предпочтительно в некоторых конкретных вариантах осуществления химическая модификация представляет собой одну или более модификаций, выбранных из группы, состоящей из:

1) модификаций путем 2'-О-метилирования в первых 2, 3, 4 или 5 нуклеотидах и последних 2, 3, 4 или 5 нуклеотидах;

2) модификаций путем 2'-О-метилирования во всех цитидинах за исключением тех, которые находятся в нацеливающем триплете;

3) 2'-О-(2-метоксиэтиловых) модификаций в первых 2, 3 или 4 нуклеотидах и последних 2, 3 или 4 нуклеотидах;

4) модификаций путем дезоксирибонуклеотидной замены первых 2, 3 или 4 нуклеотидов и последних 2, 3 или 4 нуклеотидов;

5) модификаций фосфоротиоатом в первых 1, 2, 3, 4 или 5 межнуклеотидных связях и последних 1, 2, 3, 4 или 5 межнуклеотидных связях;

6) модификаций фосфоротиоатом во всех межнуклеотидных связях или по меньшей мере в каждой второй межнуклеотидной связи за исключением того, что одна или более из 5'- или 3'-ближайших межнуклеотидных связей каждого из нуклеотидов в нацеливающем триплете не модифицированы фосфоротиоатом.

В некоторых вариантах осуществления арРНК содержит любую химическую модификацию, выбранную из группы, состоящей из:

CM0, CM1, CM2, CM3, CM4, CM6, CM148, CM149, CM150, CM151, CM152, CM153,

CM94, CM119, CM120, CM123, или CM125.

В некоторых вариантах осуществления сайт мутации G в A, на который нацелена арПНК, представляет собой сайт мутации в NM_000203.4(IDUA)-с.1205G>A (p.Trp402Ter) или соответствующий ему сайт мутации в геноме пациента с синдромом Гурлера. В некоторых вариантах осуществления арПНК содержит любую последовательность, выбранную из группы, состоящей из:

1)Gm* Am*Cm-G*Cm-Cm*Cm-A*Cm-Cm*G-Um*G-Um*G-G*Um-Um*G-Cm*Um-G*Um-Cm*Um-Cm*Cm-A*G-G*A-Cm*G-G*Um-Cm*G-G*Um-Cm*Cm-Cm*G-G*Cm-Cm*Um-G*Cm-G*Cm-Cm*Um-G*Cm-G*Cm-G*A-Cm*A-Cm*Um-Um*Um-G*G-Cm-C-C-A*G-A*G-Cm*Um-G*Cm-Um*Um*Um*Um*Um*Am (SEQ ID NO: 31);

2)Gm* Am*Cm-G*Cm-Cm*Cm-A*-Cm-Cm*G-Um*G-Um*G-G*Um-Um*G-Cm*Um-G*Um-Cm*CM-A*G-G*A-Cm*G-G*Um-Cm*G*Um-Cm*G-G*Um-Cm*G-G*Um-Cm*Um-G*Um-G*Um-G*-G*-A-Cm*A-Cm*A-Cm*Um-Um*Um-G*G-Cm*Cd-Cd*Ad*-G-A*G-Cm*Um-G*Cm-Um*Um*Um*Um*Am (SEQ ID NO: 31);

3)Gm* Am*Cm-G*Cm-Cm*Cm-A*Cm-Cm*G-Um*G-Um*G-G*Um-Um*G-G*Um-Um*G-Cm*Um-G*Um-Cm*Um-Cm*Um-Cm*A*G-G*A-Cm*-G-G*Um-Cm*-Cm*-G*Um-Cm*G-G*Um-Cm*Um-G*G-Cm*Um-G*-Cm*Um-G*-Cm-G*A-Cm*A-Cm*A-Cm*Um-Um*Um-G*G-Cm-Cd-Cd*Ad*G-A*G-Cm*Um-G*Cm-Um*Um*Um*Um*Am (SEQ ID NO: 31);

4)Gmoe* Amoe*Cmoe*Gmoe-C-C-C-A-C-C-C-G-Um-G-Um-G-G-Um-Um-G-C-Um-G-Um-C-C-A-G-G-G-Um-G-Um-C-C-A-G-G-G-A-G-A-C-G-G-G-Um-C-C-G-Gm-G-C-C-C-A-G-A-G-C-Um-G-C-Um-C*Cmoe*Umoe*Cmoe*Amoe (SEQ ID NO: 31) или

5)G+*A+*C+*G+C-C-C-A-C-C-C-G-Um-G-Um-G-G-Um-Um-G-C-Um-G-Um-C-C-A-G-G-A-G-G-A-A-G-G-A-C-C-G-G-Um-G A-G-C-Um-G-C-Um-C*C+*U+*C+*A+ (SEQ ID NO: 31).

В некоторых вариантах осуществления арПНК вводят в клетку способом, выбранным из группы, состоящей из: электропорации, трансфекции липосом, доставки экзосом или доставки липидных наночастиц (LNP). Предпочтительно арПНК вводят в клетку путем трансфекции липосом. В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой клетку человека. В некоторых вариантах осуществления клетка выбрана из группы, состоящей из: стволовых клеток, хондроцитов, периостальных клеток,

мезенхимальных клеток, кардиомиоцитов, нейральных клеток или гепатоцитов. В некоторых вариантах осуществления клетка предпочтительно представляет собой гепатоцит.

В некоторых вариантах осуществления способ направленного редактирования целевой РНК в клетке на основе технологии LEAPER включает введение в клетку множества, например, 2, 3, 4 или более, арРНК с различными последовательностями и/или имеющих различные химические модификации.

В некоторых вариантах осуществления арРНК вводят в клетки многократно, например, 2, 3, 4 или более раз. В некоторых вариантах осуществления способ, используемый для каждого введения арРНК, является одинаковым, например, все они представляют собой трансфекцию липосом, или все они представляют собой доставку липидных наночастиц. В некоторых вариантах осуществления способ, используемый для каждого введения арРНК, различается в зависимости от состояния клетки.

В некоторых вариантах осуществления в клетки вводят арРНК только однократно. В некоторых вариантах осуществления количество арРНК при однократном введении в клетки составляет 5 нМ или более, предпочтительно больше или равно 10 нМ, дополнительно предпочтительно больше или равно 20 нМ; в некоторых конкретных вариантах осуществления количество арРНК при однократном введении в клетки составляет от 5 до 160 нМ, например, от 10 до 160 нМ, от 20 до 160 нМ, от 40 до 160 нМ, от 20 до 80 нМ, от 40 до 80 нМ или от 20 до 40 нМ; в некоторых конкретных вариантах осуществления количество арРНК при однократном введении в клетки составляет 15 нМ, 17 нМ, 19 нМ, 21 нМ, 22 нМ, 23 нМ, 24 нМ, 25 нМ, 26 нМ, 27 нМ, 28 нМ, 29 нМ, 30 нМ, 31 нМ, 32 нМ, 33 нМ, 34 нМ, 35 нМ, 36 нМ, 37 нМ, 38 нМ, 39 нМ, 41 нМ, 43 нМ, 45 нМ, 55 нМ, 65 нМ, 75 нМ, 85 нМ, 95 нМ, 105 нМ, 115 нМ, 125 нМ, 135 нМ, 145 нМ или 155 нМ. В некоторых вариантах осуществления для введения арРНК в клетки осуществляют несколько введений, и интервал между двумя ближайшими введениями составляет 21 день или менее, например, больше или равно 17 дней, больше или равно 14 дней, больше или равно 12 дней, больше или равно 11 дней или больше или равно 10 дней; в некоторых вариантах осуществления интервал между двумя ближайшими введениями составляет от 9 до 20 дней, от 9 до 16 дней, от 9 до 14 дней, от 12 до 19 дней, от 12 до 15 дней или от 12 до

13 дней; в некоторых вариантах осуществления интервал между двумя ближайшими введениями составляет 7 дней, 8 дней, 11 дней, 15 дней, 18 дней, 19 дней или 20 дней.

В некоторых вариантах осуществления способ направленного редактирования целевой РНК в клетке на основе технологии LEAPER не включает введение в клетку какого-либо экзогенного белка или кодирующей последовательности экзогенного белка. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает введение экзогенной ADAR в клетку пациента. В некоторых конкретных вариантах осуществления экзогенный ADAR представляет собой ADAR1, содержащую мутацию E1008. В некоторых вариантах осуществления способ может также включать введение ингибитора ADAR3 в клетку-хозяина. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает введение стимулятора интерферона в клетку-хозяина.

Как можно видеть из данных и результатов примеров данной заявки, в соответствии со способом, описанным в данной заявке, скорость восстановления (эффективность редактирования A>G) сайта мутации (G>A) целевого аденозина составляет по меньшей мере около 20 %, например, по меньшей мере около 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 % или выше.

арРНК

В одном аспекте настоящего изобретения дополнительно предложена арРНК, содержащая комплементарную последовательность РНК, которая гибридизуется с целевой РНК, и где арРНК путем гибридизации с целевой РНК способна рекрутировать аденозиндезаминазу, действующую на РНК (ADAR), которая дезаминирует целевой аденозин в целевой РНК, где целевая РНК содержит сайт мутации гуанозина (G) в аденозин (A) (целевой аденозин). В некоторых вариантах осуществления целевой триплет образован целевым аденозином вместе со своим 5'-ближайшим нуклеотидом и 3'-ближайшим нуклеотидом, где целевой триплет представляет собой 5'-UAG-3'.

В некоторых вариантах осуществления арРНК содержит одно или более ошибочных спариваний, неоднозначных спариваний и/или односторонних выпетливаний с комплементарной последовательностью РНК, кодирующей IDUA. В некоторых вариантах осуществления арРНК не содержит область, способную образовывать

внутримолекулярную структуру типа «стебель-петля» для рекрутинга фермента ADAR. В некоторых вариантах осуществления нуклеотид в арРНК, который расположен напротив целевого аденозина, (нацеливающий нуклеотид) представляет собой цитидин (C), аденозин (A) или уридин (U), предпочтительно C. В некоторых вариантах осуществления 5'-ближайший нуклеотид нацеливающего аденозина представляет собой C, G или U. В некоторых вариантах осуществления 3'-ближайший нуклеотид нацеливающего аденозина представляет собой A. В некоторых вариантах осуществления нацеливающий триплет, образованный нацеливающим нуклеотидом вместе с его 5'-ближайшим нуклеотидом и 3'-ближайшим нуклеотидом, представляет собой 5'-ССА-3'. В некоторых вариантах осуществления арРНК дополнительно содержит один или более гуанозинов, каждый из которых расположен напротив конкретного аденозина (нецелевого аденозина), отличного от целевого аденозина в целевой РНК. В некоторых вариантах осуществления арРНК содержит два или более смежных ошибочно спаренных нуклеотида, расположенных напротив нецелевых аденозинов в целевой РНК.

В некоторых вариантах осуществления длина арРНК составляет более 61 nt, например, длина арРНК составляет от 62 до 121 nt, от 62 до 111 nt, от 62 до 101 nt, от 62 до 100 nt, от 62 до 91 nt, от 62 до 76 nt или от 62 до 70 nt; в некоторых вариантах осуществления длина арРНК представляет собой целое число нуклеотидов, выбранное из любого от 62 до 121 nt; в некоторых конкретных вариантах осуществления длина арРНК составляет 62 nt, 63 nt, 64 nt, 65 nt, 66 nt, 67 nt, 68 nt, 69 nt, 70 nt, 71 nt, 72 nt, 73 nt, 74 nt, 75 nt, 76 nt, 77 nt, 78 nt, 79 nt, 80 nt, 81 nt, 82 nt, 83 nt, 84 nt, 85 nt, 86 nt, 87 nt, 88 nt, 89 nt, 90 nt, 92 nt, 95 nt, 98 nt, 100 nt, 103 nt или 106 nt.

В некоторых вариантах осуществления расстояние от нацеливающего нуклеотида арРНК до 3'-конца арРНК меньше, чем расстояние от нацеливающего нуклеотида до 5'-конца арРНК. В некоторых вариантах осуществления расстояние от нацеливающего нуклеотида арРНК до ее 3'-конца составляет более 8 nt, например, от 9 до 60 nt, предпочтительно от 9 до 45 nt или от 9 до 35 nt; в некоторых вариантах осуществления, чтобы избежать сверхдлинных поли G-структур, где это возможно, расстояние от нацеливающего нуклеотида арРНК до ее 3'-конца выбрано из: от 9 до 25 nt, от 9 до 26 nt или от 9 до 27 nt; предпочтительно в некоторых вариантах осуществления расстояние от

нацеливающего нуклеотида арРНК до ее 3'-конца выбрано из группы: от 9 до 20 nt, от 9 до 21 nt или от 9 до 22 nt; в некоторых конкретных вариантах осуществления расстояние от нацеливающего нуклеотида арРНК до ее 3'-конца представляет собой любое целое число нуклеотидов, выбранное из от 9 до 25 nt, например, 10 nt, 11 nt, 12 nt, 13 nt, 14 nt, 15 nt, 16 nt, 17 nt, 18 nt, 19 nt, 23 nt или 24 nt. В некоторых вариантах осуществления расстояние от нацеливающего нуклеотида арРНК до ее 5'-конца составляет более 25 nt, например, от 26 до 60 nt, от 35 до 60 nt или от 45 до 60 nt; в некоторых предпочтительных вариантах осуществления расстояние от нацеливающего нуклеотида арРНК до ее 5'-конца выбрано из группы, состоящей из: 45 nt, 45 nt, 46 nt, 47 nt, 48 nt, 49 nt, 50 nt, 51 nt, 52 nt, 53 nt, 54 nt, 55 nt, 56 nt, 57 nt, 58 nt или 59 nt.

В некоторых вариантах осуществления расстояние от нацеливающего нуклеотида арРНК до 5'-конца арРНК меньше, чем расстояние от нацеливающего нуклеотида до 3'-конца арРНК. В некоторых вариантах осуществления расстояние от нацеливающего нуклеотида арРНК до 5'-конца арРНК составляет более 35 nt, например, от 36 до 60 nt или от 36 до 55 nt; предпочтительно расстояние от нацеливающего нуклеотида арРНК до 5'-конца арРНК выбрано из группы, состоящей из: 54 nt, 53 nt, 52 nt, 51 nt, 50 nt, 49 nt, 48 nt, 47 nt, 46 nt, 45 nt, 44 nt, 43 nt, 42 nt, 41 nt, 40 nt, 39 nt, 38 nt или 36 nt.

В некоторых вариантах осуществления арРНК представляет собой арРНК, имеющую характеристику длины, выбранную из группы, состоящей из: 55nt-c-35nt, 55nt-c-25nt, 55nt-c-24nt, 55nt-c-21nt, 55nt-c-20nt, 55nt-c-19nt, 55nt-c-18nt, 55nt-c-17nt, 55nt-c-16nt, 55nt-c-15nt, 55nt-c-14nt, 55nt-c-13nt, 55nt-c-12nt, 55nt-c-11nt, 55nt-c-10nt, 55nt-c-9nt, 50nt-c-20nt, 50nt-c-15nt, 45nt-c-55nt или 45nt-c-20nt. Предпочтительно арРНК представляет собой арРНК, имеющую характеристику длины, выбранную из группы, состоящей из: 55nt-c-20nt, 55nt-c-15nt или 55nt-c-14nt.

В некоторых вариантах осуществления арРНК представляет собой олигонуклеотид. В некоторых вариантах осуществления арРНК содержит одну или более химических модификаций. В некоторых вариантах осуществления химическая модификация представляет собой одну или более модификаций, выбранных из группы, состоящей из: модификации путем 2'-О-метилирования, модификации фосфоротиоатом, модификации путем дезоксирибонуклеотидной замены, LNA модификации и 2'-О-(2-метоксиэтиловой)

модификации. В некоторых вариантах осуществления химическая модификация представляет собой одну или более модификаций, выбранных из группы, состоящей из:

- 1) модификаций путем 2'-О-метилирования в первых 2, 3, 4 или 5 нуклеотидах;
- 2) модификаций путем 2'-О-метилирования в последних 2, 3, 4, или 5 нуклеотидах;
- 3) модификаций путем 2'-О-метилирования во всех цитидинах за исключением тех, которые находятся в нацеливающем триplete;
- 4) 2'-О-(2-метоксиэтиловых) модификаций в первых 2, 3 или 4 нуклеотидах;
- 5) 2'-О-(2-метоксиэтиловых) модификаций в последних 2, 3 или 4 нуклеотидах;
- 6) модификаций путем дезоксирибонуклеотидной замены первых 2, 3 или 4 нуклеотидов;
- 7) модификаций путем дезоксирибонуклеотидной замены последних 2, 3 или 4 нуклеотидов;
- 8) модификаций фосфоротиоатом в первых 1, 2, 3, 4 или 5 межнуклеотидных связях;
- 9) модификаций фосфоротиоатом в последних 1, 2, 3, 4 или 5 межнуклеотидных связях;
- 10) модификаций фосфоротиоатом во всех межнуклеотидных связях за исключением того, что одна или более из 5'- или 3'-ближайших межнуклеотидных связей каждого из нуклеотидов в нацеливающем триplete не являются модифицированными фосфоротиоатом; и
- 11) модификаций фосфоротиоатом в межнуклеотидных связях с интервалом в 1, 2, 3 или 4 нуклеотида за исключением того, что одна или более из 5'- или 3'-ближайших межнуклеотидных связей каждого из нуклеотидов в нацеливающем триplete не являются модифицированными фосфоротиоатом.

Предпочтительно в некоторых конкретных вариантах осуществления химическая модификация представляет собой одну или более модификаций, выбранных из группы, состоящей из:

- 1) модификаций путем 2'-О-метилирования в первых 2, 3, 4 или 5 нуклеотидах и последних 2, 3, 4 или 5 нуклеотидах;
- 2) модификаций путем 2'-О-метилирования во всех цитидинах за исключением тех,

которые находятся в нацеливающем триplete;

3) 2'-O-(2-метоксиэтиловых) модификаций в первых 2, 3 или 4 нуклеотидах и последних 2, 3 или 4 нуклеотидах;

4) модификаций путем дезоксирибонуклеотидной замены первых 2, 3 или 4 нуклеотидов и последних 2, 3 или 4 нуклеотидов;

5) модификаций фосфоротиоатом в первых 1, 2, 3, 4 или 5 межнуклеотидных связях и последних 1, 2, 3, 4 или 5 межнуклеотидных связях;

6) модификаций фосфоротиоатом во всех межнуклеотидных связях или по меньшей мере в каждой второй межнуклеотидной связи за исключением того, что одна или более из 5'- или 3'-ближайших межнуклеотидных связей каждого из нуклеотидов в нацеливающем триplete не модифицированы фосфоротиоатом.

В некоторых вариантах осуществления арРНК содержит любую химическую модификацию, выбранную из группы, состоящей из:

CM0, CM1, CM2, CM3, CM4, CM6, CM148, CM149, CM150, CM151, CM152, CM153, CM94, CM119, CM120, CM123, или CM125.

В некоторых вариантах осуществления целевая РНК, на которую нацелена арРНК, выбрана из: пре-мРНК, зрелой мРНК, рибосомной РНК, транспортной РНК, длинноцепочечной некодирующей РНК или малой РНК. В некоторых вариантах осуществления целевая РНК представляет собой предшественник матричной РНК. В некоторых вариантах осуществления целевая РНК представляет собой последовательность транскрипта гена IDUA. В некоторых вариантах осуществления целевая РНК представляет собой пре-мРНК или зрелую мРНК, транскрибируемую из гена IDUA. В некоторых вариантах осуществления целевая РНК представляет собой пре-мРНК, транскрибируемую из гена IDUA. В некоторых вариантах осуществления целевая РНК содержит сайт мутации, эквивалентный сайту мутации NM_000203.4(IDUA)-c.1205G>A (p.Trp402Ter) в геноме пациента с синдромом Гурлера, и когда арРНК гибридизуется с целевой РНК, нацеливающий нуклеотид арРНК расположен напротив сайта мутации в целевой РНК. При этом сайт мутации представляет собой целевой нуклеотид арРНК. В некоторых вариантах осуществления арРНК может быть использована в способе редактирования РНК, описанном ранее.

В некоторых вариантах осуществления арРНК содержит любую последовательность, выбранную из группы, состоящей из:

1)Gm*Am*Cm-G*Cm-Cm*Cm-A*Cm-Cm*G-Um*G-Um*G-G*Um-Um*G-Cm*Um-G*Um-Cm*Um-Cm*Cm-A*G-G*A-Cm*G-G*Um-Cm*G-G*Um-Cm*Cm-Cm*G-G*Cm-Cm*Um-G*Cm-G*Cm-Cm*Um-G*Cm-G*Cm-G*A-Cm*A-Cm*Um-Um*Um-G*G-Cm-C-A*G-A*G-Cm*Um-G*Cm-Um*Um*Um*Um*Um*Am (SEQ ID NO: 31);

2)Gm*Am*Cm-G*Cm-Cm*Cm-A*-Cm-Cm*G-Um*G-Um*G-G*Um-Um*G-Cm*Um-G*Um-Cm*CM-A*G-G*A-Cm*G-G*Um-Cm*G*Um-Cm*G-G*Um-Cm*G-G*Um-Cm*Um-G*Um-G*Um-G*-G*-A-Cm*A-Cm*A-Cm*Um-Um*Um-G*G-Cm*Cd-Cd*Ad*-G-A*G-Cm*Um-G*Cm-Um*Um*Um*Um*Am (SEQ ID NO: 31);

3)Gm*Am*Cm-G*Cm-Cm*Cm-A*Cm-Cm*G-Um*G-Um*G-G*Um-Um*G-G*Um-Um*G-Cm*Um-G*Um-Cm*Um-Cm*Cm-A*G-G*A-Cm*-G-G*Um-Cm*-Cm*-G*Um-Cm*G-G*Um-Cm*Um-G*G-Cm*Um-G*-Cm*Um-G*-Cm-G*A-Cm*A-Cm*A-Cm*Um-Um*Um-G*G-Cm-Cd-Cd*Ad*G-A*G-Cm*Um-G*Cm-Um*Um*Um*Um*Am (SEQ ID NO: 31);

4)Gmoe*Amoe*Smoe*Gmoe-C-C-C-A-C-C-C-G-Um-G-Um-G-G-Um-Um-G-C-Um-G-Um-C-C-A-G-G-G-Um-G-Um-C-C-A-G-G-G-A-G-A-C-G-G-G-Um-C-C-G-Gm-G-C-C-C-A-G-A-G-C-Um-G-C-Um-C*Smoe*Umoe*Smoe*Amoe (SEQ ID NO: 31) или

5)G+*A+*C+*G+C-C-C-A-C-C-C-G-Um-G-Um-G-G-Um-Um-G-C-Um-G-Um-C-C-A-G-G-A-G-G-A-A-G-G-A-C-C-G-G-Um-G A-G-C-Um-G-C-Um-C*C+*U+*C+*A+ (SEQ ID NO: 31).

Конструкция, композиция, частица, клетка, библиотека или набор

В одном аспекте настоящего изобретения также предложена конструкция, содержащая кодирующую последовательность арРНК, ранее описанную в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления конструкция представляет собой одноцепочечную ДНК. В некоторых вариантах осуществления конструкция представляет собой двухцепочечную ДНК. В некоторых вариантах осуществления конструкция представляет собой гибридную молекулу РНК и ДНК. В некоторых вариантах осуществления конструкция представляет собой двухцепочечную РНК. В некоторых вариантах осуществления конструкция содержит бессмысловую последовательность

нуклеиновых кислот арРНК.

В некоторых вариантах осуществления конструкция имеет форму петли. В некоторых вариантах осуществления конструкция является линейной.

В некоторых вариантах осуществления конструкция представляет собой плазмиду. В некоторых вариантах осуществления конструкция содержит весь геном вируса или его часть. В некоторых вариантах осуществления вирус выбран из AAV (аденоассоциированный вирус), лентивируса, фага или бакуловируса. Таким образом, в настоящей заявке также предложен вирус, содержащий конструкцию. В одном аспекте настоящего изобретения также предложены композиция, липосома, экзосома, липидная наночастица, клетка, библиотека или набор, содержащие вышеупомянутую арРНК или вышеупомянутую конструкцию. В некоторых вариантах осуществления композиция, липосома, экзосома, липидная наночастица, клетка, библиотека или набор содержат только одну из вышеупомянутых арРНК или конструкций, содержащих кодирующие последовательности арРНК. В некоторых вариантах осуществления композиция, липосома, экзосома, липидная наночастица, клетка, библиотека или набор содержат две или более из вышеупомянутых арРНК или конструкций, содержащих кодирующие последовательности арРНК.

В некоторых вариантах осуществления композиция представляет собой фармацевтическую композицию, так что композиция дополнительно содержит один или более фармацевтически приемлемых эксципиентов.

В некоторых вариантах осуществления клетка содержит конструкцию, и конструкция расположена в цитоплазме. В некоторых вариантах осуществления клетка содержит конструкцию, и указанная конструкция представляет собой часть геномной ДНК.

Способ предотвращения или лечения синдрома Гурлера

В одном аспекте настоящего изобретения также предложен способ лечения или предотвращения синдрома Гурлера, причем указанный способ включает введение пациенту (с синдромом Гурлера, имеющим сайт мутации, эквивалентный NM_000203.4(IDUA)-c.1205G>A (p.Trp402Ter)) вышеупомянутой арРНК или вышеупомянутой конструкции, липосомы, экзосомы, липидной наночастицы или клетки,

или предотвращения или лечения симптомов, связанных с синдромом Гурлера, у пациента с помощью вышеупомянутого способа редактирования РНК.

В некоторых вариантах осуществления введение выбрано из: внутривенной инъекции, подкожной инъекции, артериальной перфузии, внутримышечной инъекции, локальной инъекции в один орган или внутрочерепной инъекции. В некоторых вариантах осуществления введение представляет собой однократное введение, например, однократную инфузию клеток, содержащих кодирующую последовательность арРНК, пациенту, позволяя, тем самым, клеткам проникнуть в конкретную ткань.

В некоторых вариантах осуществления введение осуществляют 2, 3 или более раз. В некоторых вариантах осуществления интервал между двумя ближайшими введениями составляет более 21 дня. В некоторых вариантах осуществления интервал между двумя ближайшими введениями составляет больше или равно 17 дней, больше или равно 14 дней, больше или равно 12 дней, больше или равно 11 дней или больше или равно 10 дней. В некоторых вариантах осуществления интервал между двумя ближайшими введениями составляет от 9 до 20 дней, от 9 до 16 дней, от 9 до 14 дней, от 12 до 19 дней, от 12 до 15 дней или от 12 до 13 дней. В некоторых вариантах осуществления интервал между двумя ближайшими введениями составляет 7 дней, 8 дней, 11 дней, 15 дней, 18 дней, 19 дней, 20 дней.

В некоторых вариантах осуществления введение поддерживает концентрацию арРНК в ткани-мишени на уровне 5 нМ или более, предпочтительно больше или равно 10 нМ, дополнительно предпочтительно больше или равно 20 нМ. В некоторых конкретных вариантах осуществления введение поддерживает концентрацию арРНК в ткани-мишени на уровне от 5 до 160 нМ, например, от 10 до 160 нМ, от 20 до 160 нМ, от 40 до 160 нМ, от 20 до 80 нМ, от 40 до 80 нМ или от 20 до 40 нМ. В некоторых конкретных вариантах осуществления введение поддерживает концентрацию арРНК в ткани-мишени на уровне 15 нМ, 17 нМ, 19 нМ, 21 нМ, 22 нМ, 23 нМ, 24 нМ, 25 нМ, 26 нМ, 27 нМ, 28 нМ, 29 нМ, 30 нМ, 31 нМ, 32 нМ, 33 нМ, 34 нМ, 35 нМ, 36 нМ, 37 нМ, 38 нМ, 39 нМ, 41 нМ, 43 нМ, 45 нМ, 55 нМ, 65 нМ, 75 нМ, 85 нМ, 95 нМ, 105 нМ, 115 нМ, 125 нМ, 135 нМ, 145 нМ или 155 нМ.

Технические решения согласно настоящей заявке более подробно описаны ниже со

ссылкой на следующие конкретные примеры, но заявка не ограничивается этими примерами. Если специально не указано иное, реагенты, указанные ниже, являются коммерчески доступными. Для простоты, некоторые операции не детализированы с точки зрения параметров, стадий и устройства, используемого в операциях, следует понимать, что они хорошо известны и воспроизводимы специалистами в данной области техники.

ПРИМЕРЫ

Клетки, GM06214 и GM01323, используемые в настоящем документе, были приобретены у Coriell, США, где GM06214 представляет собой фибробласт, полученный от пациента с синдромом Гурлера с мутацией G в A в нуклеотиде 1293 в экзоне 9 гена IDUA, и кодон которого мутирован из TGG в TAG, ([Trp402Ter (W402X)]) (вышеприведенное описание клетки взято из описания продукта, где описанная мутация соответствует мутации NM_000203.4(IDUA)-c.1205G>A (p.Trp402Ter)). В тоже время GM01323 представляет собой фибробласт, полученный от пациента с болезнью Шейе (SDS), активность IDUA которого составляет 0,3 % от активности в фибробластах, полученных от здорового человека. По сравнению с синдромом Гурлера, симптомы болезни Шейе относительно легкие. Таким образом, GM01323 использовали в качестве положительного контроля ферментативной активности IDUA, и GM06214 использовали в качестве модели заболевания и тестовой клетки в следующих примерах.

Пример 1: Обнаружение генотипа мутанта GM06214

Клетки GM06214 помещали в культуральную среду фибробластов (ScienCell, FM среда, кат. № 2301), содержащей 15% сыворотку и с добавлением 1% добавки для роста фибробластов (ScienCell, GFS, кат. № 2301), инкубировали в течение 2-3 дней при 37 °C в 5% CO₂ инкубаторе. Когда конфлюэнтность клеток достигала 90 %, клетки расщепляли 0,25% трипсином, затем расщепление прекращали с помощью культуральной среды фибробластов, содержащей 15% сыворотку. Экстракцию ДНК проводили с использованием TianGene® (TIANGEN Biotech (Beijing) Co., Ltd.) набора для экстракции ДНК клетки (кат. № DP304-03) в соответствии с руководством по использованию.

Дизайн праймера для восходящей и нисходящей последовательностей целевых

сайтов IDUA выполняли с использованием NCBI-Primer blast (URL: <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). Проводили реакции ПЦР, и продукты ПЦР подвергали секвенирование по Сенгеру. Как показано на фиг. 1, проверяли, что мутантный тип вышеуказанной клетки GM06214 подтвержден как патогенная мутация G в A в положении 15704 на геноме IDUA, т.е.: с.1205G>A (p.Trp402Ter) мутация.

Пример 2: Обнаружение ферментативной активности IDUA и эффективность редактирования после электропорации клеток GM06214 с apPНК

Следующие последовательности apPНК были сконструированы и синтезированы для восходящей и нисходящей последовательностей целевых сайтов в предшественнике мPНК (пре-мPНК) и зрелой мPНК после транскрипции гена IDUA:

Нацеливающая apPНК для пре-мPНК:

GACGCCACCGUGUGGUUGCUGUCCAGGACGGUCCCGGCCUGCGACACUUC
GGCCCAGAGCUGCUCCUCAUCCAGCAGCGCCAGCAGCCCCAUGGCCGUGAGCACC
GGCUU (SEQ ID NO: 3, Pre-55nt-c-55nt).

Нацеливающая apPНК для зрелой мPНК:

GACGCCACCGUGUGGUUGCUGUCCAGGACGGUCCCGGCCUGCGACACUUC
GGCCCAGAGCUGCUCCUCAUCUGCGGGGCGGGGGGGGGCCGUCGCCGCGUGGGGU
CGUUG (SEQ ID NO: 4, m-55nt-c-55nt).

Случайно сконструированная нецелевая apPНК:

UACCGCUACAGCCACGCUGAUUUCAGCUAUACCUGCCCGGUAAUAAAGGGAC
GUUCACACCGCGAUGUUCUCUGCUGGGGAAUUGCGCGAUUUCAGGAUAAAAG
AAGUGC (SEQ ID NO: 5, случайная-111nt).

В частности, основания в сайтах мутаций, нацеливающих apPНК (целевой аденозин в целевой последовательности), предшественника мPНК (пре-мPНК) и зрелой мPНК, представляли собой C, так что между целевым аденозином и основанием в apPНК, соответствующим целевому аденозину, образовывалось ошибочное спаривание A-C. Длина синтезированной apPНК была выбрана равной 111 nt. Синтезированную apPНК

химически модифицировали с помощью способа СМ0 (первые 3 и последние 3 нуклеотида в последовательности арРНК модифицировали путем 2'-О-метиляции, и первые 3 и последние 3 межнуклеотидные связи модифицировали с помощью модификации фосфоротиоатом, соответственно). Клетки подвергали электропорации с использованием следующих стадий.

Клетки расщепляли, когда клетки GM06214 достигали около 90 % конфлюэнтности, затем прекращали расщепление и проводили подсчет. Для электропорации 6 миллионов клеток ресуспендировали с 400 мкл предварительно смешанного раствора для электропорации (Lonza, кат. № V4XP-3024), затем добавляли 20 мкг арРНК для хорошего перемешивания, отбирали каждые 20 мкл в качестве одной системы электропорации и выполняли электропорацию с использованием предварительно заданных условий электропорации прибора для электропорации Lonza Nucleofector. После электропорации клетки быстро переносили в 2 мл культуральной среды фибробластов (ScienCell, FM среда, кат. № 2301), содержащей 15% сыворотку, и инокулировали в 6-луночные планшеты. Клетки инкубировали при 37°C в 5% CO₂ инкубаторе.

Через сорок восемь часов после электропорации клетки собирали и анализировали на ферментативную активность и частоту мутации А в G в IDUA мРНК.

Обнаружение частоты мутации А в G в IDUA мРНК

Сконструированную синтетическую арРНК растворяли до желаемой концентрации водой, не содержащей РНКазы (Transgen Biotech, кат. № GI201-01), и хранили при температуре минус 80 °С. Клетки расщепляли, когда клетки GM06214 достигали около 90 % конфлюэнтности, подсчитывали после прекращения расщепления. Один миллион клеток отбирали для добавления 200 пмоль арРНК, и проводили электропорацию в объеме 100 мкл. Через сорок восемь часов после электропорации клетки подсчитывали и измеряли жизнеспособность. Клетки переносили в центрифужные пробирки, не содержащие РНКазы, супернатант отбрасывали, и РНК экстрагировали с помощью набора для экстракции РНК QIAGEN (QIAGEN, кат. № 74134). Согласно инструкциям, 0,35 мл буфера RLT Plus добавляли как 5×10^5 клеток для перемешивания путем пипетирования вверх и вниз (если для экстракции РНК непосредственно использовали замороженные

клетки, промывали один раз PBS). Суспензию лизированных клеток добавляли в колонку для центрифугирования gDNA Eliminator, центрифугировали при 8000 g или больше в течение 30 с, затем удаляли колонку для оставления жидкости. Объем 70% этанола добавляли для перемешивания путем пипетирования вверх и вниз, затем сразу же выполняли следующую стадию. Жидкость добавляли в колонку для центрифугирования RNeasyMinElute, центрифугировали при 8000 g или больше в течение 15 с, затем отбрасывали отработанную жидкость. В колонку для центрифугирования RNeasyMinElute добавляли 700 мкл буфера RW1, центрифугировали при 8000 g или больше в течение 15 с, затем отбрасывали отработанный раствор. В колонку RNeasyMinElute добавляли 500 мкл буфера RPE, центрифугировали при 8000 g или больше в течение 15 с, затем отбрасывали отработанную жидкость. В колонку для центрифугирования RNeasyMinElute добавляли 500 мкл 80% этанола, центрифугировали при 8000 g или больше в течение 2 мин, затем отбрасывали отработанную жидкость. Колонку для центрифугирования RNeasyMinElute помещали в пробирку для сбора объемом 2 мл, центрифугировали на максимальной скорости с открытой крышкой в течение 5 минут, чтобы дать колонке высохнуть. Колонку для центрифугирования RNeasyMinElute помещали в пробирку для сбора объемом 1,5 мл и по каплям добавляли 14 мкл воды, не содержащей РНКазу, в центр мембраны колонки для центрифугирования, затем центрифугировали на максимальной скорости в течение 1 минуты для элюирования РНК.

Концентрацию экстрагированной РНК измеряли с помощью Nanodrop (Thermo, кат. № Nanodrop2000), и использовали 1 мкг РНК для обратной транскрипции (Thermo, обратная транскриптаза кат. № 28025013). Систему обратной транскрипции конструировали, как показано в таблице 1, после инкубации при 65 °С в течение 5 минут её немедленно охлаждали на ледяной бане. Затем систему, как показано в таблице 2, использовали для непрерывной инкубации при 37 °С в течение 50 минут. Обратную транскриптазу затем инактивировали при 70 °С в течение 15 минут. ПЦР проводили с использованием праймеров ПЦР в Примере 1 в условиях, показанных в таблице 3. После ПЦР для электрофореза в агарозном геле отбирали 2 мкл продукта ПЦР и по результатам электрофореза изначально определяли концентрацию продукта ПЦР и правильный размер полосы. После очистки продукт ПЦР использовали для подготовки библиотеки и

отправляли на секвенирование второго поколения.

Все последующие тесты, включающие обратную транскрипцию, проводили с использованием системы обратной транскрипции и процедур, раскрытых в этом примере.

Таблица 1. Конфигурация-1 системы обратной транскрипции

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

Таблица 2. Конфигурация-2 системы обратной транскрипции

	Объем (мкл)
Система таблицы 1	12 мкл
5X буфер для синтеза первой цепи	4
0,1 М DTT (дитиотреитол)	2
Ингибитор рекомбинантной нуклеазы RNaseOUT™	1
M-MLV (вирус мышиноного лейкоза Молони)	1
Общий объем	20

Таблица 3. Условия ПЦР

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

Обнаружение ферментативной активности

После расщепления клетки GM06214 центрифугировали, затем ресуспендировали в 28 мкл 1×PBS (фосфатно-солевой буферный раствор), содержащем 0,1% Triton X-100, и лизировали на льду в течение 30 минут. Затем 25 мкл клеточного лизата добавляли к 25 мкл субстрата, содержащего 190 мкм 4-метилумбеллиферил- α -L-идуронидазы (Cayman, 2A-19543-500, растворенная в 0,4 М натрий-формиатном буфере, содержащем 0,2% Triton X-100, pH 3,5), инкубируя в течение 90 мин при 37 °C в темноте. Добавляли 200 мкл 0,5 М раствора NaOH/глицин (Beijing Chemical, NaOH, кат. № AR500G; Solarbio, глицин кат. № G8200) с pH=10,3 для инактивации каталитической реакции, центрифугируя при 4 °C в течение 2 мин. Супернатант переносили на 96-луночные планшеты, и значения флуоресценции измеряли на приборе Infinite M200 (TECAN) с длинами волн возбуждения 365 нм и 450 нм.

Результаты, полученные в этом примере, показаны на фиг. 2, при нацеливании на пре-мРНК арРНК могла проявлять высокую ферментативную активность и эффективность редактирования, при нацеливании на зрелую мРНК арРНК проявляла значительно более низкую ферментативную активность и эффективность редактирования. Таким образом, все арРНК, используемые в более поздних примерах, представляли собой арРНК, нацеленные на пре-мРНК.

Пример 3: Обнаружение эффективности редактирования целевого сайта IDUA на линии IDUA-репортерных клеток после электропорации арРНК

Как показано на фиг. 3A, сегмент последовательности транскрипта гена IDUA, содержащий человеческий (NM_000203.4(IDUA)-c.1205G>A (p.Trp402Ter)) сайт мутации (IDUA)_c.1239G>A (p.Trp402Ter) и около 100 п.о. (пар оснований) каждой из восходящей и нисходящей вставляли между экспрессирующими последовательностями белков mCherry и GFP на лентивирусной плазмиде для конструирования плазмиды. Вышеуказанную сконструированную плазмиду упаковывали в виде вирусов для инфицирования клеток 293T. IDUA-репортерные моноклональные клетки подвергали скринингу после интеграции вируса в геном. Моноклональные клетки экспрессировали только белок mcherry из-за воздействия стоп-кодона TAG (где расположен целевой

аденозин IDUA) во вставленной последовательности, и когда клетку редактировали арРНК, он превращался из TAG в TGG, после чего последующий белок GFP экспрессировался нормально. Соотношение положительных клеток для белка GFP может отражать эффективность редактирования арРНК-редактированных клеток. Авторы изобретения предпочтительно сконструировали четыре (25nt-c-25nt, 35nt-c-35nt, 45nt-c-45nt и 55nt-c-55nt) арРНК различной длины от 51 nt до 111 nt и четыре нецелевые случайные контрольные арРНК (111nt-случайная, 91nt-случайная, 71nt-случайная и 51nt-случайная). Каждая арРНК была химически модифицирована с помощью способа СМ0. Последовательности арРНК, используемые в этом примере, показаны в таблице 4 ниже.

После того, как клетки отдельно трансфицировали различными арРНК с условиями электропорации, указанными в примере 2, соотношение GFP-положительных клеток определяли с 1 по 7 день, соответственно, для предварительного сравнения эффективности редактирования. Как видно на фиг. 3В, самый высокий пик редактирования наблюдался в день 2 (48 ч). Последовательность с самой высокой эффективностью редактирования представляла собой 45nt-c-45nt с общей длиной 91 nt, и арРНК с общей длиной 51 nt имела очень низкую эффективность редактирования. Это показывает, что длина арРНК не должна быть слишком короткой, но также не наблюдалось того, что чем больше длина последовательности, тем выше эффективность редактирования.

Таблица 4.

111nt-случайная	SEQ ID NO: 5 uaccgcuacagccacgcugauuuucagcuauaccugcccgguaauaaagggacguucacaccgcgaug uucucugcuggggaauugcgcgauauucaggauuaaaagaagugc
91nt-случайная	SEQ ID NO: 6 uaauccugaauaucgcgcauuicccccagcagagaacaucgcggugugaacguicccuuuauaccgg gcagguauagcugaaaucagcugggc
71nt-случайная	SEQ ID NO: 7 uuucagcuauaccugcccgguaauaaagggacguucacaccgcgauguuucucugcuggggaauugc

	gcgaua
51nt-случайная	SEQ ID NO: 8 uuccccagcagagaacaucgcgguugugaacgucssuuuuauaccgggcaggu
55nt-c-55nt	SEQ ID NO: 4 gacgcccaccgugugguugcuguccaggacggucccgccugcgacacuucggcccagagcugcu ccucaucugcggggcgggggggggccgucgccguggggucguug
45nt-c-45nt	SEQ ID NO: 9 gugugguugcuguccaggacggucccgccugcgacacuucggcccagagcugcuccucaucugc ggggcgggggggggccgucgccgcu
35nt-c-35nt	SEQ ID NO: 10 uguccaggacggucccgccugcgacacuucggcccagagcugcuccucaucugcggggcggggg ggggcc
25nt-c-25nt	SEQ ID NO: 11 ggucccgccugcgacacuucggcccagagcugcuccucaucugcggggcg

Пример 4: Обнаружение эффективности редактирования РНК в различные моменты времени после электропорации клеток GM06214 с арРНК различной длины

Различные длины арРНК (см. таблицу 4, каждая арРНК была химически модифицирована способом CM0) электропорировали в клетки GM06214 с использованием условий электропорации, указанных в примере 2, после электропорации внутриклеточную ферментативную активность обнаруживали соответственно в день 2, 4, 6, 8, 10, 12 и 14, и частоту мутации А в G целевых сайтов РНК в клетках также обнаруживали в день 2 и 4 с помощью способа, раскрытого в примере 3, соответственно. Результаты показаны на фиг. 4А и 4В. Наивысшая ферментативная активность наблюдалась, когда арРНК составляла 91 nt (45-с-45), и ферментативная активность IDUA оставалась на высоком уровне на день 6 после электропорации. Что касается частоты мутации А в G, то 111 nt и 91 nt продемонстрировали приблизительно одинаковую эффективность редактирования. В то время как арРНК 51 nt была неизменно неспособна достичь желаемой эффективности редактирования.

Пример 5: Оптимизация арРНК

Посредством литературных исследований авторы изобретения пришли к выводу, что электропорация не может полностью соответствовать цели будущего лечения заболевания. Поэтому авторы изобретения протестировали метод трансфекции липосом. Например, в этом примере авторы изобретения использовали липтофектамин RNAiMAX (Invitrogen 13778-150) для трансфекции арРНК. Во-первых, авторы изобретения сконструировали новые арРНК путем усечения последовательности на обоих концах на основе 111 nt, а затем конструкцию расширяли путем фиксации одного конца при усечении другого конца. С помощью этого способа конструирования было сгенерировано 14 последовательностей арРНК. Четыре случайные последовательности (случайные) также конструировали в качестве контролей. Последовательности арРНК, используемые в этом примере, показаны в таблице 5 ниже. Каждая арРНК была химически модифицирована с помощью способа СМ0. При тестировании ферментативной активности IDUA через 48 ч после трансфекции (тот же способ, что и в примере 3) было обнаружено, что эффективность редактирования снижается, когда длина арРНК равна 111 nt или больше; и в случае арРНК равной длины, более высокая эффективность редактирования может быть достигнута, когда длины последовательностей, фланкирующих нацеливающий нуклеотид С, не одинаковы, и когда длина 5'-концевой фланкирующей последовательности нацеливающего нуклеотида С больше, чем длина 3'-концевой фланкирующей последовательности, эффективность редактирования, как правило, выше (фиг. 5). Среди них, предпочтительно, когда фланкирующая последовательность нацеливающего нуклеотида С на 3'-конце арРНК составляет более 5 nt, в частности, в диапазоне от 5 до 45 nt, арРНК достигает наивысшего значения эффективности редактирования; и когда фланкирующая последовательность нацеливающего нуклеотида С на 5'-конце предпочтительно превышает 25 nt, в частности, когда она превышает 35 nt, эффективность редактирования арРНК значительно повышается. Следует отметить, что ферментативная активность арРНК с более короткими суммарными длинами, такими как 61 nt, 51 nt, является стабильно низкой.

Кроме того, для арРНК, протестированных в этом примере, клетки,

редактированные следующими арРНК, имеют лучшую ферментативную активность IDUA: 45nt-с-55nt (SEQ ID NO: 17), имеющая общую длину 101 nt, 55nt-с-35nt (SEQ ID NO: 13), имеющая общую длину 91 nt, 55nt-с-25nt (SEQ ID NO: 24), имеющая общую длину 81 nt, и 55nt-с-15nt (SEQ ID NO: 25), имеющая общую длину 71 nt.

Таблица 5.

111nt-случайная	SEQ ID NO: 5 uaccgcuacagccacgcugauuuucagcuauaccugcccgguaauaaagggacguucacaccgcgau guucucugcuggggaauugcgcgauauucaggauuaaaagaagugc
91nt-случайная	SEQ ID NO: 6 uaaucsugaauaucgcgcauuccccagcagagaacaucgcgugugaacgucssuuuauaccgg gcagguauagcugaaaucagcugggc
71nt-случайная	SEQ ID NO: 7 uuucagcuauaccugcccgguaauaaagggacguucacaccgcgauguucucugcuggggaauug cgcgaua
51nt-случайная	SEQ ID NO: 8 uuccccagcagagaacaucgcgugugaacgucssuuuauaccgggcaggu
55nt-с-55nt	SEQ ID NO: 4 gacgccaccgugugguugcuguccaggacggucccgccugcgacacuucggcccagagcugcu ccucaucugcggggcgggggggggccgucgccguggggucguug
45nt-с-45nt	SEQ ID NO: 9 gugugguugcuguccaggacggucccgccugcgacacuucggcccagagcugcuccucaucug cgggcgggggggggccgucgccgcu
35nt-с-35nt	SEQ ID NO: 10 uguccaggacggucccgccugcgacacuucggcccagagcugcuccucaucugcggggcgggg ggggcc
25nt-с-25nt	SEQ ID NO: 11 ggucccgccugcgacacuucggcccagagcugcuccucaucugcggggcg
55nt-с-45nt	SEQ ID NO: 12

	gacgccaccgugugguugcuguccaggacggucccgccugcgacacuucggcccagagcugcu ccucaucugcggggcgggggggggccgucgccgcu
55nt-c-35nt	SEQ ID NO: 13 gacgccaccgugugguugcuguccaggacggucccgccugcgacacuucggcccagagcugcu ccucaucugcggggcgggggggggcc
55nt-c-25nt	SEQ ID NO: 14 gacgccaccgugugguugcuguccaggacggucccgccugcgacacuucggcccagagcugcu ccucaucugcggggcg
55nt-c-15nt	SEQ ID NO: 15 gacgccaccgugugguugcuguccaggacggucccgccugcgacacuucggcccagagcugcu ccucau
55nt-c-5nt	SEQ ID NO: 16 gacgccaccgugugguugcuguccaggacggucccgccugcgacacuucggcccagagc
45nt-c-55nt	SEQ ID NO: 17 gugugguugcuguccaggacggucccgccugcgacacuucggcccagagcugcuccucaucug cggggcgggggggggccgucgccguggggucguug
35nt-c-55nt	SEQ ID NO: 18 uguccaggacggucccgccugcgacacuucggcccagagcugcuccucaucugcggggcgggg ggggccgucgccguggggucguug
25nt-c-55nt	SEQ ID NO: 19 ggucccgccugcgacacuucggcccagagcugcuccucaucugcggggcgggggggggccguc gccguggggucguug
15nt-c-55nt	SEQ ID NO: 20 ugcgacacuucggcccagagcugcuccucaucugcggggcgggggggggccgucgccguggg gucguug
5nt-c-55nt	SEQ ID NO: 21 cggcccagagcugcuccucaucugcggggcgggggggggccgucgccguggggucguug

Пример 6: Скрининг на оптимальную длину от сайта редактирования до 3'-конца

РНК гена IDUA содержит множество смежных цитидинов (С) вблизи целевого сайта. Таким образом, при конструировании арРНК, комплементарной последовательности целевой РНК, аналогом множества смежных С является множество гуанозинов (G). Поли G, состоящий из множества G, трудно синтезировать при текущем уровне технологии химического синтеза, и поэтому его следует избегать. Поскольку множество G расположено в положении 20 nt от целевого сайта (4 смежных G) и в положении 25 nt (9 смежных G) в направлении 3'-конца нацеливающего нуклеотида. Следовательно, во всех последующих примерах авторы изобретения пытались сделать 3'-концевую фланкирующую последовательность нацеливающего нуклеотида С сконструированной арРНК меньше чем 25 nt, чтобы насколько это возможно избежать наличия поли G-структур, при этом предпочтительная 3'-концевая фланкирующая последовательность нацеливающего нуклеотида С составляет менее чем 20 nt.

В примере 6 авторы изобретения обнаружили более высокую ферментативную активность IDUA и частоту мутации А в G для последовательностей 81nt:55-c-25 и 71nt:55-c-15, что отражает их относительно высокую эффективность редактирования. Чтобы найти более короткую и лучшую длину 3'-концевой фланкирующей последовательности нацеливающего нуклеотида С, авторы изобретения также сконструировали и протестировали последовательности, начиная с расстояния (от сайта редактирования до 3'-конца) от 25 nt (81nt:55-c-25) до 10 nt (66nt:55nt-c-10nt). Последовательности арРНК показаны в таблице 6. Каждая арРНК была химически модифицирована с помощью способа СМ0. Клетки GM06214 трансфицировали липофектамином RNAiMAX, затем инокулировали в 6-луночные планшеты с 3×10^5 клетками на лунку за один день до трансфекции, и свежую культуральную среду меняли для клеток в день трансфекции. Клетки трансфицировали арРНК в концентрации 20 нМ. Клетки собирали через 48 часов после трансфекции для обнаружения ферментативной активности.

Метод обнаружения ферментативной активности осуществляли следующим образом: клетки GM06214 расщепляли для центрифугирования, затем ресуспендировали с 33 мкл $1 \times$ PBS, содержащего 0,1% Triton X-100. После лизиса на льду в течение 30 мин клетки центрифугировали при 4 °C в течение 2 мин. Затем 25 мкл клеточного лизата

добавляли к 25 мкл субстрата, содержащего 190 мкМ 4-метилумбеллиферил- α -L-идуронидазы (Glycosynth, 44076). Субстрат растворяли в буфере, содержащем 0,4 М формиата натрия и 0,2% Triton X-100 (pH 3,5), для инкубирования при 37 °C в течение 30 минут в темноте. После этого добавляли 200 мкл 0,5 М раствора NaOH/глицина (pH 10,3) (Beijing Chemical Industry, NaOH, кат. № AR500G; Solarbio, глицин кат. № G8200) для инактивации каталитической реакции. Значения флуоресценции измеряли с помощью прибора Infinite M200 (TECAN) и света возбуждения 365 нм и 450 нм. Клеточные лизаты брали для измерения концентрации.

Как показано на фиг. 6А, при измерении ферментативной активности IDUA (результаты показаны как: кратности ферментативной активности IDUA в клетках GM01323) можно наблюдать, что все арРНК, в которых расстояние от нацеливающего нуклеотида до 3'-конца составляет от 25 до 10 nt, достигают более желательной эффективности редактирования. Чтобы дополнительно сократить длину 3'-фланкирующей последовательности нацеливающего нуклеотида, авторы изобретения синтезировали новую партию арРНК, в которой расстояние от нацеливающего нуклеотида до 3'-конца составляет от 16 до 5 nt. Результаты ферментативной активности IDUA показаны на фиг. 6В. Результаты в отношении ферментативной активности, полученные после трансфекции клеток GM06214 теми же последовательностями арРНК в течение 48 часов в 2 экспериментальных результатах, были в основном одинаковыми. Кроме того, арРНК с длиной от 7 до 10 nt 3'-концевой фланкирующей последовательности нацеливающего нуклеотида также демонстрируют относительно хорошую эффективность редактирования, и арРНК с длиной от 9 до 10 nt 3'-концевой фланкирующей последовательности нацеливающего нуклеотида являются более эффективными. Из результатов на фиг. 6В также видно, что эффективность редактирования арРНК с общей длиной ниже 61 nt всегда ниже, чем ожидалось.

Суммируя данные примера 6 и результаты, представленные на фиг. 6А и 6В, можно сделать вывод, что длина 3'-концевой фланкирующей последовательности нацеливающего нуклеотида арРНК предпочтительно должна быть ограничена в диапазоне от 9 до 25nt. И общая длина арРНК не должна быть ниже 61 nt.

Таблица 6.

55nt-c-25nt	SEQ ID NO: 14: gacgcccaccgugugguugcuguccaggacggucccggccugcgacacuucggcccagagcug cuccucaucugcggggcg
55nt-c-24nt	SEQ ID NO: 22: gacgcccaccgugugguugcuguccaggacggucccggccugcgacacuucggcccagagcug cuccucaucugcggggcg
55nt-c-23nt	SEQ ID NO: 23: gacgcccaccgugugguugcuguccaggacggucccggccugcgacacuucggcccagagcug cuccucaucugcggggcg
55nt-c-22nt	SEQ ID NO: 24: gacgcccaccgugugguugcuguccaggacggucccggccugcgacacuucggcccagagcug cuccucaucugcggggcg
55nt-c-21nt	SEQ ID NO: 25: gacgcccaccgugugguugcuguccaggacggucccggccugcgacacuucggcccagagcug cuccucaucugcggggcg
55nt-c-20nt	SEQ ID NO: 26: gacgcccaccgugugguugcuguccaggacggucccggccugcgacacuucggcccagagcug cuccucaucugcggggcg
55nt-c-19nt	SEQ ID NO: 27: gacgcccaccgugugguugcuguccaggacggucccggccugcgacacuucggcccagagcug cuccucaucugcggggcg
55nt-c-18nt	SEQ ID NO: 28: gacgcccaccgugugguugcuguccaggacggucccggccugcgacacuucggcccagagcug cuccucaucugcggggcg
55nt-c-17nt	SEQ ID NO: 29: gacgcccaccgugugguugcuguccaggacggucccggccugcgacacuucggcccagagcug cuccucaucu
55nt-c-16nt	SEQ ID NO: 30: gacgcccaccgugugguugcuguccaggacggucccggccugcgacacuucggcccagagcug

	cuccucauc
55nt-c-15nt	SEQ ID NO: 15: gacgcccaccgugugguugcuguccaggacggucccgccugcgacacuucggcccagagcug cuccucau
55nt-c-14nt	SEQ ID NO: 31 gacgcccaccgugugguugcuguccaggacggucccgccugcgacacuucggcccagagcug cuccuca
55nt-c-13nt	SEQ ID NO: 32: gacgcccaccgugugguugcuguccaggacggucccgccugcgacacuucggcccagagcug cuccuc
55nt-c-12nt	SEQ ID NO: 33: gacgcccaccgugugguugcuguccaggacggucccgccugcgacacuucggcccagagcug cuccu
55nt-c-11nt	SEQ ID NO: 34: gacgcccaccgugugguugcuguccaggacggucccgccugcgacacuucggcccagagcug cucc
55nt-c-10nt	SEQ ID NO: 35: gacgcccaccgugugguugcuguccaggacggucccgccugcgacacuucggcccagagcug cuc
55nt-c-9nt	SEQ ID NO: 36: gacgcccaccgugugguugcuguccaggacggucccgccugcgacacuucggcccagagcug cu
55nt-c-8nt	SEQ ID NO: 37: gacgcccaccgugugguugcuguccaggacggucccgccugcgacacuucggcccagagcug c
55nt-c-7nt	SEQ ID NO: 38: gacgcccaccgugugguugcuguccaggacggucccgccugcgacacuucggcccagagcug
55nt-c-6nt	SEQ ID NO: 39: gacgcccaccgugugguugcuguccaggacggucccgccugcgacacuucggcccagagcu

55nt-c-5nt	SEQ ID NO: 16: gacgcccaccgugugguugcuguccaggacggucccgccugcgacacacuucggcccagagc
случайная-70nt	SEQ ID NO: 40: uaccgcuacagccacgcugauuuucagcuauaccugcccgguaauaaaggacguucacaccgcga uguucu
случайная-67nt	SEQ ID NO: 41: uaccgcuacagccacgcugauuuucagcuauaccugcccgguaauaaaggacguucacaccgcga ug

Пример 7: Скрининг на оптимальную 5'-концевую длину при условии, что предпочтительная 3'-концевая длина была фиксированной

Авторы изобретения выбрали 2 различные длины арРНК: 76nt:55-c-20, 71nt:55-c-15, с фиксированной длиной 3'-концевой фланкирующей последовательности нацеливающего нуклеотида, при этом 5'-конец постепенно усекали, как показано в таблице 7. Каждая арРНК была химически модифицирована с помощью способа СМ0. После трансфекции клеток GM06214 липофектамином RNAiMAX ферментативную активность IDUA измеряли с помощью тестов. Результаты показаны на фиг. 7. Когда общая длина арРНК была ниже 61 nt, ее эффективность редактирования резко снижалась. В то время как в случае, если общая длина арРНК составляла более 61 nt, ферментативная активность IDUA клеток после редактирования с помощью арРНК значительно повышается, когда длина 3'-концевой фланкирующей последовательности нацеливающего нуклеотида составляет 15 nt или 20 nt, и длина 5'-концевой фланкирующей последовательности нацеливающего нуклеотида составляет более 40 nt. Как показано на фиг. 7.

Таблица 7.

55nt-c-20nt	SEQ ID NO: 26: gacgcccaccgugugguugcuguccaggacggucccgccugcgacacacuucggcccagagcugcuccuc aucugcg
50nt-c-20nt	SEQ ID NO: 42: ccaccgugugguugcuguccaggacggucccgccugcgacacacuucggcccagagcugcuccucaucug

	cg
45nt-c-20nt	SEQ ID NO: 43: gugugguugcuguccaggacggucccgccugcgacacuucggcccagagcugcuccucaucugcg
40nt-c-20nt	SEQ ID NO: 44: guugcuguccaggacggucccgccugcgacacuucggcccagagcugcuccucaucugcg
35nt-c-20nt	SEQ ID NO: 45: uguccaggacggucccgccugcgacacuucggcccagagcugcuccucaucugcg
55nt-c-15nt	SEQ ID NO: 15: gacgcccaccgugugguugcuguccaggacggucccgccugcgacacuucggcccagagcugcuccucau
50nt-c-15nt	SEQ ID NO: 46: ccaccgugugguugcuguccaggacggucccgccugcgacacuucggcccagagcugcuccucau
45nt-c-15nt	SEQ ID NO: 47: gugugguugcuguccaggacggucccgccugcgacacuucggcccagagcugcuccucau
40nt-c-15nt	SEQ ID NO: 48: guugcuguccaggacggucccgccugcgacacuucggcccagagcugcuccucau
35nt-c-15nt	SEQ ID NO: 49: uguccaggacggucccgccugcgacacuucggcccagagcugcuccucau

Пример 8: Исследование влияния сдвига положения нацеливающего нуклеотида на эффективность редактирования целевого сайта

Три длины арРНК были выбраны из предыдущих примеров для изучения влияния сдвига положения нацеливающего нуклеотида на эффективность редактирования целевого сайта. Ряд последовательностей арРНК был сконструирован путем постепенного перемещения нацеливающего нуклеотида из центрального положения в 3'-концевом направлении, с учетом требования, предъявляемого к синтезу арРНК, направленного на то, чтобы избежать некоторых неблагоприятных структур для синтеза. АрРНК показаны в таблице 8. Каждая арРНК была химически модифицирована с помощью способа СМ0. Образцы собирали для обнаружения ферментативной активности (обнаружение

ферментативной активности проводили в соответствии со способом, описанным в Примере 7, и результаты демонстрировали в виде кратности ферментативной активности IDUA в GM01323) через 48 часов после трансфекции клеток GM06214 липофектамином RNAiMAX. Экспериментальные результаты показаны на фиг. 8. При перемещении положения нацеливающего нуклеотида на арРНК с общей длиной 67 nt, 70 nt и 72 nt указанное перемещение положения нацеливающего нуклеотида не оказывало значительного влияния на ферментативную активность, при этом общую длину сохраняли на постоянном уровне, а длина 5'-концевой фланкирующей последовательности нацеливающего нуклеотида составляла от 43 до 55 nt, и длина 3'-концевой фланкирующей последовательности нацеливающего нуклеотида составляла от 9 до 25 nt. Таким образом, этот пример демонстрирует, что для каждой арРНК была достигнута относительно хорошая эффективность редактирования в вышеупомянутом предпочтительном диапазоне длин арРНК, 5'-длин и 3'-длин.

Таблица 8.

67nt	55nt-c-11nt	gacgcccaccgugugguugcuguccaggacggucccgccugcgacacuuicggccca gagcugcucc (SEQ ID NO: 34)
	54nt-c-12nt	acgcccaccgugugguugcuguccaggacggucccgccugcgacacuuicggcccag agcugcuccu (SEQ ID NO: 50)
	53nt-c-13nt	cgcccaccgugugguugcuguccaggacggucccgccugcgacacuuicggcccaga gcugcuccuc (SEQ ID NO: 51)
	52nt-c-14nt	gcccaccgugugguugcuguccaggacggucccgccugcgacacuuicggcccagag cugcuccuca (SEQ ID NO: 52)
	51nt-c-15nt	cccaccgugugguugcuguccaggacggucccgccugcgacacuuicggcccagagc ugcuccucau (SEQ ID NO: 53)
	50nt-c-16nt	ccaccgugugguugcuguccaggacggucccgccugcgacacuuicggcccagagcu gcuccucauc (SEQ ID NO: 54)
	49nt-c-17nt	caccgugugguugcuguccaggacggucccgccugcgacacuuicggcccagagcug succucauc (SEQ ID NO: 55)
	48nt-c-18nt	accgugugguugcuguccaggacggucccgccugcgacacuuicggcccagagcugc

		uccucaucug (SEQ ID NO: 56)
	47nt-c-19nt	ccgugugguugcuguccaggacggucccgccugcgacacuucggcccagagcugcu ccucaucugc (SEQ ID NO: 57)
	46nt-c-20nt	cgugugguugcuguccaggacggucccgccugcgacacuucggcccagagcugcuc cucaucugcg (SEQ ID NO: 58)
	45nt-c-21nt	gugugguugcuguccaggacggucccgccugcgacacuucggcccagagcugcucc ucaucugcgg (SEQ ID NO: 59)
	44nt-c-22nt	ugugguugcuguccaggacggucccgccugcgacacuucggcccagagcugcuccu caucugcggg (SEQ ID NO: 60)
	43nt-c-23nt	gugguugcuguccaggacggucccgccugcgacacuucggcccagagcugcuccuc aucugcgggg (SEQ ID NO: 61)
70nt	55nt-c-14nt	gagcccaccgugugguugcuguccaggacggucccgccugcgacacuucggccca gagcugcuccuca (SEQ ID NO: 31)
	54nt-c-15nt	acgccaccgugugguugcuguccaggacggucccgccugcgacacuucggcccag agcugcuccucau (SEQ ID NO: 62)
	53nt-c-16nt	cgcccaccgugugguugcuguccaggacggucccgccugcgacacuucggcccaga gcugcuccucauc (SEQ ID NO: 63)
	52nt-c-17nt	gccaccgugugguugcuguccaggacggucccgccugcgacacuucggcccagag cugcuccucauc (SEQ ID NO: 64)
	51nt-c-18nt	cccaccgugugguugcuguccaggacggucccgccugcgacacuucggcccagagc ugcuccucaucug (SEQ ID NO: 65)
	50nt-c-19nt	ccaccgugugguugcuguccaggacggucccgccugcgacacuucggcccagagcu gcuccucaucugc (SEQ ID NO: 66)
	49nt-c-20nt	caccgugugguugcuguccaggacggucccgccugcgacacuucggcccagagcug cuccucaucugcg (SEQ ID NO: 67)
	48nt-c-21nt	accgugugguugcuguccaggacggucccgccugcgacacuucggcccagagcugc uccucaucugcgg (SEQ ID NO: 68)
	47nt-c-22nt	ccgugugguugcuguccaggacggucccgccugcgacacuucggcccagagcugcu ccucaucugcggg (SEQ ID NO: 69)

	46nt-c-23nt	cgugugguugcuguccaggacggucccgccugcgacacuucggcccagagcugcuc cucaucugcgggg (SEQ ID NO: 70)
72nt	55nt-c-16nt	gacgcccaccgugugguugcuguccaggacggucccgccugcgacacuucggcca gagcugcuccucauc (SEQ ID NO: 30)
	54nt-c-17nt	acgcccaccgugugguugcuguccaggacggucccgccugcgacacuucggcccag agcugcuccucaucu (SEQ ID NO: 71)
	53nt-c-18nt	cgcccaccgugugguugcuguccaggacggucccgccugcgacacuucggcccaga gugcuccucaucug (SEQ ID NO: 72)
	52nt-c-19nt	gcccaccgugugguugcuguccaggacggucccgccugcgacacuucggcccagag cugcuccucaucugc (SEQ ID NO: 73)
	51nt-c-20nt	cccaccgugugguugcuguccaggacggucccgccugcgacacuucggcccagagc ugcuccucaucugcg (SEQ ID NO: 74)
	50nt-c-21nt	ccaccgugugguugcuguccaggacggucccgccugcgacacuucggcccagagcu gucuccucaucugcgg (SEQ ID NO: 75)
	49nt-c-22nt	caccgugugguugcuguccaggacggucccgccugcgacacuucggcccagagcug cuccucaucugcggg (SEQ ID NO: 76)
	48nt-c-23nt	accgugugguugcuguccaggacggucccgccugcgacacuucggcccagagcugc uccucaucugcgggg (SEQ ID NO: 77)

Пример 9: Влияние химических модификаций арРНК на эффективность редактирования

Во-первых, авторы изобретения сравнили влияние модификации СМ1 по сравнению с модификацией СМ0 на эффективность редактирования арРНК при трех длинах арРНК (55-с-16 (SEQ ID NO: 30), 55-с-14 (SEQ ID NO: 31) и 55-с-11 (SEQ ID NO: 34)). Модификации СМ1 показаны ниже:

СМ1: первые 3 и последние 3 нуклеотида в последовательности арРНК были соответственно модифицированы путем 2'-О-метилования, первые 3 и последние 3 межнуклеотидные связи в последовательности арРНК были соответственно модифицированы фосфоротиоатом, и все уридины последовательности были

модифицированы путем 2'-О-метилирования;

Результаты показаны на фиг. 9А, и эффективность редактирования арРНК, модифицированных с помощью СМ1, в целом была выше, чем у арРНК, модифицированных с помощью СМ0.

Затем авторы изобретения выбрали 2 предпочтительные длины арРНК: 71 nt и 76 nt и исследовали влияние различных комбинаций модификаций на эффективность редактирования. Конкретные модификации показаны ниже, и конкретные последовательности и аннотации модификаций показаны в таблице 9.

СМ2: первые 3 и последние 3 нуклеотида в последовательности арРНК были соответственно модифицированы путем 2'-О-метилирования, и первые 3 и последние 3 межнуклеотидные связи в последовательности арРНК были соответственно модифицированы фосфоротиоатом; и 3'-ближайший нуклеотид нацеливающего нуклеотида был модифицирован путем 2'-О-метилирования.

СМ3: первые 3 и последние 3 нуклеотида в последовательности арРНК были соответственно модифицированы путем 2'-О-метилирования, первые 3 и последние 3 межнуклеотидные связи в последовательности арРНК были соответственно модифицированы фосфоротиоатом; и 5'-ближайший нуклеотид нацеливающего нуклеотида был модифицирован путем 2'-О-метилирования.

СМ4: первые 3 и последние 3 нуклеотида в последовательности арРНК были соответственно модифицированы путем 2'-О-метилирования, первые 3 и последние 3 межнуклеотидные связи в последовательности арРНК соответственно были модифицированы фосфоротиоатом; и 3'-ближайшая межнуклеотидная связь каждого из трех оснований в нацеливающем триplete была модифицирована фосфоротиоатом.

СМ5: Все нуклеотиды были модифицированы путем 2'-О-Ме, за исключением нацеливающего нуклеотида и 5 оснований, ближайших к его 5'-концу, и 5 оснований, ближайших к его 3'-концу; и первые и последние три межнуклеотидные связи последовательности были модифицированы фосфоротиоатом.

СМ6: первые 5 и последние 5 нуклеотидов в последовательности арРНК были соответственно модифицированы путем 2'-О-метилирования, и первые 5 и последние 5 межнуклеотидных связей последовательности были соответственно модифицированы

фосфоротиоатом.

мРНК IDUA редактировали путем трансфекции различных арРНК в клетки GM06214 отдельно с использованием липофектамина RNAiMAX. Через 48 ч после трансфекции клетки собирали для обнаружения ферментативной активности IDUA (определение ферментативной активности проводили в соответствии со способом, раскрытым в Примере 7, и результаты демонстрировали в виде кратности ферментативной активности в GM01323). Как видно из экспериментальных результатов, показанных на фиг. 9B, за исключением CM5, другие комбинации модификаций демонстрируют хорошую эффективность редактирования по сравнению с модификацией CM1.

Обнаружение ферментативной активности IDUA позволяет сравнить способность различных длин арРНК восстанавливать функцию белка IDUA на уровне белка. Для того, чтобы иметь возможность быстро изучить способность редактирования арРНК на уровне РНК, в этом примере также определяли эффективность редактирования арРНК с использованием метода ферментативного расщепления. Конкретный способ заключается в следующем: нормальная последовательность сайта вблизи точечной мутации мРНК IDUA содержит CTGG, который после мутации становится CTAG. В частности, четыре основания CTAG представляют собой сайты рестрикции рестрикционной эндонуклеазы BfaI, поэтому, если трансфицированная арРНК реализует редактирование А в G на целевом сайте в клетке, сайт рестрикции CTAG рестрикционной эндонуклеазы BfaI будет трансформирован в CTGG, и, таким образом, ферментативное расщепление BfaI больше не будет происходить. Через 48 часов после трансфекции клетки с помощью арРНК, геном клетки экстрагировали для осуществления обратной транскрипции. Образцы подвергали ПЦР с использованием праймеров hIDUA-62F: CCTTCCTGAGCTACCACCCG (SEQ ID NO: 78) и hIDUA-62R: CCAGGGCTCGAACTCGGTAG (SEQ ID NO: 79). Продукты ПЦР очищали и извлекали для ферментативного расщепления. Ферментативно расщепленные продукты подвергали гель-электрофорезу с 2% агарозы, и эффективность редактирования рассчитывали путем расчета процента серого значения необрезанных фрагментов относительно общего серого значения на гелевой карте. Как показано на фиг. 9C, результаты эффективности редактирования демонстрируют тенденцию, согласующуюся с результатами ферментативной активности арРНК.

Таблица 9.

Название	Длина	Модификация	Последовательность
HIV2-76- CM1	55nt-c- 20nt	CM1	Gm*Am*Cm*G-C-C-C-A-C-C-G-Um-G-Um-G-G- Um-Um-G-C-Um-G-Um-C-C-A-G-G-A-C-G-G-Um -C-C-C-G-G-C-C-Um-G-C-G-A-C-A-C-Um-Um-C- G-G-C-C-C-A-G-A-G-C-Um-G-C-Um-C-C-Um-C- A-Um-C-Um*Gm*Cm*Gm (SEQ ID NO: 26)
HIV2-76- CM2	55nt-c- 20nt	CM2	Gm*Am*Cm*G-C-C-C-A-C-C-G-Um-G-Um-G-G- Um-Um-G-C-Um-G-Um-C-C-A-G-G-A-C-G-G-Um -C-C-C-G-G-C-C-Um-G-C-G-A-C-A-C-Um-Um-C- G-G-C-C-C-Am-G-A-G-C-Um-G-C-Um-C-C-Um-C- -A-Um-C-Um*Gm*Cm*Gm (SEQ ID NO: 26)
HIV2-76- CM3	55nt-c- 20nt	CM3	Gm*Am*Cm*G-C-C-C-A-C-C-G-Um-G-Um-G-G- Um-Um-G-C-Um-G-Um-C-C-A-G-G-A-C-G-G-Um -C-C-C-G-G-C-C-Um-G-C-G-A-C-A-C-Um-Um-C- G-G-C-Cm-C-A-G-A-G-C-Um-G-C-Um-C-C-Um-C- -A-Um-C-Um*Gm*Cm*Gm (SEQ ID NO: 26)
HIV2-76- CM4	55nt-c- 20nt	CM4	Gm*Am*Cm*G-C-C-C-A-C-C-G-Um-G-Um-G-G- Um-Um-G-C-Um-G-Um-C-C-A-G-G-A-C-G-G-Um -C-C-C-G-G-C-C-Um-G-C-G-A-C-A-C-Um-Um-C- G-G-C-C*C*A*G-A-G-C-Um-G-C-Um-C-C-Um-C- A-Um-C-Um*Gm*Cm*Gm (SEQ ID NO: 26)
HIV2-76- CM5	55nt-c- 20nt	CM5	Gm*Am*Cm*Gm-Cm-Cm-Cm-Am-Cm-Cm-Gm-U m-Gm-Um-Gm-Gm-Um-Um-Gm-Cm-Um-Gm-Um- Cm-Cm-Am-Gm-Gm-Am-Cm-Gm-Gm-Um-Cm-Cm -Cm-Gm-Gm-Cm-Cm-Um-Gm-Cm-Gm-Am-Cm-A m-Cm-Um-Um-C-G-G-C-C-C-A-G-A-G-C-Um-Gm -Cm-Um-Cm-Cm-Um-Cm-Am-Um-Cm-Um*Gm*C m*Gm (SEQ ID NO: 26)

HIV2-76- CM6	55nt-c- 20nt	CM6	Gm*Am*Cm*Gm*Cm*C-C-A-C-C-G-U-G-U-G-G-U-U-G-C-U-G-U-C-C-A-G-G-A-C-G-G-U-C-C-C-G-G-C-C-U-G-C-G-A-C-A-C-U-U-C-G-G-C-C-C-A-G-A-G-C-U-G-C-U-C-C-U-C-A-U*Cm*Um*Gm*Um*Gm (SEQ ID NO: 26)
HIV2-71- CM1	55nt-c- 15nt	CM1	Gm*Am*Cm*G-C-C-C-A-C-C-G-Um-G-Um-G-G-Um-Um-G-C-Um-G-Um-C-C-A-G-G-A-C-G-G-Um-C-C-C-G-G-C-C-Um-G-C-G-A-C-A-C-Um-Um-C-G-G-C-C-C-A-G-A-G-C-Um-G-C-Um-C-C-Um*Am*Um (SEQ ID NO: 15)
HIV2-71- CM2	55nt-c- 15nt	CM2	Gm*Am*Cm*G-C-C-C-A-C-C-G-Um-G-Um-G-G-Um-Um-G-C-Um-G-Um-C-C-A-G-G-A-C-G-G-Um-C-C-C-G-G-C-C-Um-G-C-G-A-C-A-C-Um-Um-C-G-G-C-C-C-Am-G-A-G-C-Um-G-C-Um-C-C-Um*Am*Um (SEQ ID NO: 15)
HIV2-71- CM3	55nt-c- 15nt	CM3	Gm*Am*Cm*G-C-C-C-A-C-C-G-Um-G-Um-G-G-Um-Um-G-C-Um-G-Um-C-C-A-G-G-A-C-G-G-Um-C-C-C-G-G-C-C-Um-G-C-G-A-C-A-C-Um-Um-C-G-G-C-Cm-C-A-G-A-G-C-Um-G-C-Um-C-C-Um*Am*Um (SEQ ID NO: 15)
HIV2-71- CM4	55nt-c- 15nt	CM4	Gm*Am*Cm*G-C-C-C-A-C-C-G-Um-G-Um-G-G-Um-Um-G-C-Um-G-Um-C-C-A-G-G-A-C-G-G-Um-C-C-C-G-G-C-C-Um-G-C-G-A-C-A-C-Um-Um-C-G-G-C-C*C*A*G-A-G-C-Um-G-C-Um-C-C-Um*Am*Um (SEQ ID NO: 15)
HIV2-71- CM5	55nt-c- 15nt	CM5	Gm*Am*Cm*Gm-Cm-Cm-Cm-Am-Cm-Cm-Gm-Um-Gm-Um-Gm-Gm-Um-Um-Gm-Cm-Um-Gm-Um-Cm-Cm-Am-Gm-Gm-Am-Cm-Gm-Gm-Um-Cm-Cm-Cm-Gm-Gm-Cm-Cm-Um-Gm-Cm-Gm-Am-Cm-A

			m-Cm-Um-Um-C-G-G-C-C-C-A-G-A-G-C-Um-Gm -Cm-Um-Cm-Cm-Um*Cm*Am*Um (SEQ ID NO: 15)
HIV2-71- CM6	55nt-c- 15nt	CM6	Gm*Am*Cm*Gm*Cm*C-C-A-C-C-G-U-G-U-G-G- U-U-G-C-U-G-U-C-C-A-G-G-A-C-G-G-U-C-C-C-G -G-C-C-U-G-C-G-A-C-A-C-U-U-C-G-G-C-C-C-A- G-A-G-C-U-G-C-U-C*Cm*Um*Cm*Am*Um (SEQ ID NO: 15)

Примечание: «m» обозначает 2'-O-Me на нуклеотидной рибозе, и «*» обозначает модификацию фосфоротиоатом.

Пример 10: Испытания градиента концентрации на CM1-модифицированных 55nt-c-16nt, 55nt-c-14nt и 55nt-c-11nt

Для исследования редактирующей способности арРНК в различных концентрациях, в этом примере для тестирования выбирали CM1-модифицированные 55nt-c-16nt, 55nt-c-14nt и 55nt-c-11nt. Брали в общей сложности 9 различных разведений арРНК при 160 нМ, 80 нМ, 40 нМ, 20 нМ, 10 нМ, 5 нМ, 2,5 нМ, 1,25 нМ и 0,625 нМ, и клетки GM06214 трансфицировали с использованием липофектамина RNAiMAX. Через сорок восемь часов после трансфекции клетки исследовали на ферментативную активность, и с помощью секвенирования второго поколения обнаруживали эффективность редактирования гена. Как показано на фиг. 10А, общая тенденция для трех арРНК была в основном одинаковой с точки зрения результатов ферментативной активности. 55nt-c-16nt-CM1 обладает более высокой ферментативной активностью, чем две другие арРНК при концентрациях трансфекции более 10 нМ. Тем не менее, все концентрации точки изменения для ферментативной активности находятся в диапазоне от 20 нМ до 5 нМ. Ниже 5нМ, эффективность редактирования больше не была удовлетворительной. Тенденция результата эффективности редактирования, обнаруженная секвенированием второго поколения, как правило, согласуется с общей ферментативной активностью, как показано на фиг. 10В. Можно видеть, что концентрация арРНК, трансфицированной с

использованием липосом, предпочтительно больше или равна 5 нМ, предпочтительно больше или равна 10 нМ и более предпочтительно больше или равна 20 нМ.

Пример 11: IDUA поддерживает протеазную активность после редактирования с помощью арРНК

В этом эксперименте с использованием трех предпочтительных арРНК, нацеленных на целевые сайты IDUA человека, и их химической модификации с помощью способа СМ1, получали значительно повышенную ферментативную активность IDUA в клетках GM06214, и она длилась больше около 3 недель.

Авторы изобретения выбрали концентрацию 20 нМ и сравнили ферментативную активность IDUA и эффективность редактирования в разное время. Как показано на фиг. 11А, после трансфекции арРНК в клетки GM06214 ферментативную активность IDUA обнаруживали последовательно в течение 14 дней. Результаты показывают, что пик ферментативной активности после трансфекции проявлялся с 4 по 10 день, и в основном с 4 по 9 день. И ферментативная активность в день 14 все еще выше, чем в день 2, затем авторы изобретения исследовали ферментативную активность в день 17 и 21, и из фиг. 12А видно, что ферментативная активность в день 21 все еще выше, чем в день 1 после трансфекции, и ферментативная активность примерно в 6-10 раз превышает активность GM01323. Эффективность редактирования целевых сайтов IDUA показана на фиг. 11В, из которой видно, что от высокой к низкой эффективности редактирования после трансфекции арРНК составляла около 70 % редактирования в качестве наивысшего пика в день 1 после трансфекции, до дня 10 после трансфекции эффективность редактирования равнялась эффективности контрольной группы.

Следовательно, легко предположить, что при повторной трансфекции в дни с 10 по 14 возможно последовательно поддерживать ферментативную активность IDUA на более высоком уровне, чем на второй день первой трансфекции. И если вторая трансфекция выполняется в дни с 17 по 21, это позволит ферментативной активности IDUA быть по меньшей мере выше, чем ферментативная активность в GM01323, поддерживая ферментативную активность IDUA клеток в относительно нормальном состоянии.

Пример 12: Редактирование *in vitro* сайта (с.1205-5bp) дикого IDUA с арРНК в первичных гепатоцитах человека

Этот тест включает редактирование сайта гена IDUA дикого типа в культивированных первичных гепатоцитах человека с помощью технологии LEAPER. В этом примере А в САГ использовали в качестве мишени для редактирования для проверки эффективности редактирования способа в соответствии с этой заявкой для гена IDUA в гепатоцитах. Последовательности арРНК показаны в таблице 10.

Первичные гепатоциты человека были приобретены у LONZA (кат. № HUCPI), и клетки выделяли и культивировали в соответствии с инструкциями производителя (среда для восстановления, кат. № MCHT50; среда для культивирования в бактериологических чашках, кат. № MP100). Клетки заменяли на среду для поддержания гепатоцитов 5C после адгезии (ссылочный документ: 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).

Через 24 часа адгезивной культуры гепатоциты человека трансфицировали арРНК с использованием липофектмина RNAiMAX, где концентрации трансфекции арРНК составляли 20 нМ и 40 нМ, соответственно. Образцы собирали соответственно через 0 ч, 12 ч, 24 ч, 48 ч и 72 ч после трансфекции. После сбора образцы анализировали на эффективность редактирования с помощью секвенирования второго поколения. Как показано на фиг. 12, после трансфекции арРНК эффективность редактирования IDUA может достигать вплоть до 40 %. Это демонстрирует возможность и эффективность редактирования целевого аденозина транскриптов IDUA в гепатоцитах человека способом согласно настоящей заявке.

Таблица 10.

Название арРНК	Длина арРНК	Модификация	Последовательность
hIV2-wt1 CM1	55nt-c-14nt	CM1	Cm*Am*Cm*-C-G-Um-G-Um-G-G-Um-Um-G -C-Um-G-Um-C-C-A-G-G-A-C-G-G-Um-C-C- C-G-G-C-C-Um-G-C-G-A-C-A-C-Um-Um-C-G -G-C-C-C-A-G-A-G-C-C-G-C-Um-C-C-Um-C-

			A-Um-C-Um*Gm*Cm*Gm (SEQ ID NO: 80)
--	--	--	------------------------------------

Пример 13: Сравнение комбинаций способов химической модификации и длин

В этом примере, редактируя сайт мутации с.1239G>A (p.Trp402Ter) в клетках GM06214, авторы изобретения сравнили способ согласно настоящей заявке с предпочтительным способом в предшествующем уровне техники. Далее показаны преимущества способа в соответствии с данной заявкой.

Последовательности и модификации показаны в таблице 11. Репрезентативная последовательность для способа согласно настоящему изобретению представляет собой 55nt-c-15nt-CM1, и последовательность положительного контроля, выбранная из предшествующего уровня техники (CN110352244A), представляет собой 36nt-c-13nt-CM11, где все нуклеотиды, за исключением сайта редактирования CCA, были модифицированы путем 2'-O-Me, и первые и последние 4 нуклеотидные связи были модифицированы фосфоротиоатом. Кроме того, в качестве контроля в данном примере были взяты CM0-модифицированная последовательность (55nt-c-15nt) и CM0-модифицированная случайная последовательность (случайная-70) данной заявки.

В этом примере через 48 часов после трансфекции арРНК в клетки GM06214 с использованием липофектамина RNAiMAX способом, показанным в примере 7, устанавливали ферментативную активность IDUA. Результаты показаны на фиг. 13. Можно видеть, что 55nt-c-15nt-CM1 имеет значительно более высокую эффективность редактирования, чем 36nt-c-13nt-CM11.

Таблица 11.

Название	Модификация	Последовательность
55nt-c-15nt-CM1	CM1	Gm*Am*Cm*G-C-C-C-A-C-C-G-Um-G-Um-G-G-Um-Um-G-C-Um-G-Um-C-C-A-G-G-A-C-G-G-Um-C-C-C-G-G-C-C-Um-G-C-G-A-C-A-C-Um-Um-C-G-G-C-C-C-A-G-A-G-C-Um-G-C-Um-C-C-Um*Cm*Am*Um (SEQ ID NO:15)

36nt-c-13nt- CM11	CM11	Cm*Um*Gm*Um*Cm-Cm-Am-Gm-Gm-Am-Cm-Gm-Gm-Um-Cm-Cm-Cm-Gm-Gm-Cm-Cm-Um-Gm-Cm-Gm-Am-Cm-Am-Cm-Um-Um-Cm-Gm-Gm-Cm-C-C-A-Gm-Am-Gm-Cm-Um-Gm-Cm-Um*Cm*Cm*Um*Cm (SEQ ID NO:81)
----------------------	------	---

Примечание: «m» обозначает модификацию путем 2'-O-Me на нуклеотидной рибозе, и «*» обозначает модификацию фосфоротиоатом.

Пример 14: Влияние концевых модификаций на эффективность редактирования арРНК

В этом примере на обоих концах арРНК на основе CM1 выполняли различные количества модификаций 2'МОЕ и LNA, и сравнивали их с модификациями с помощью CM1, где 2'МОЕ относится к 2'-O-(2-метоксиэтиловой) модификации.

Как показано в таблице 12, последовательность 55nt-c-20nt (SEQ ID NO: 26) модифицировали с помощью CM1, CM148, CM149, CM150, CM151, CM152 и CM153, соответственно, для тестирования в этом примере. В данном примере использовали липофектамин RNAiMAX для трансфекции арРНК в репортерные клетки IDUA при концентрации трансфекции 20 нМ. Затем измеряли интенсивность флуоресценции с помощью проточной цитометрии через 48 ч (день 2) и 168 ч (день 7), соответственно. Результаты показаны на фиг. 14. Можно видеть, что CM151 имеет значительно более высокую эффективность редактирования, за которой следует CM148. Кроме того, все из CM148, CM149, CM150, CM151, CM152 и CM153 превосходят способ модификации CM1.

Конкретные способы модификации, используемые в этом примере (за исключением CM1, который описан ранее), показаны ниже:

CM148: первые 4 и последние 4 нуклеотида в последовательности арРНК были соответственно модифицированы 2'-O-(2-метоксиэтилом), первые 3 и последние 4 межнуклеотидные связи в последовательности арРНК были соответственно модифицированы фосфоротиоатом, и все уридины последовательности были модифицированы путем 2'-O-Me.

CM149: первые 3 и последние 3 нуклеотида в последовательности арРНК были соответственно модифицированы 2'-O-(2-метоксиэтилом), первые 2 и последние 3 межнуклеотидные связи в последовательности арРНК были соответственно модифицированы фосфоротиоатом, и все уридины последовательности были модифицированы путем 2'-O-Me.

CM150: первые 2 и последние 2 нуклеотида в последовательности арРНК были соответственно модифицированы 2'-O-(2-метоксиэтилом), первая и последние 2 межнуклеотидные связи в последовательности арРНК были соответственно модифицированы фосфоротиоатом, и все уридины последовательности были модифицированы путем 2'-O-Me.

CM151: первые 4 и последние 4 нуклеотида в последовательности арРНК были соответственно модифицированы путем LNA модификации, первые 3 и последние 4 межнуклеотидные связи в последовательности арРНК были соответственно модифицированы фосфоротиоатом, и все уридины последовательности были модифицированы путем 2'-O-Me.

CM152: первые 3 и последние 3 нуклеотида в последовательности арРНК были соответственно модифицированы путем LNA модификации, первые 2 и последние 3 межнуклеотидные связи в последовательности арРНК были соответственно модифицированы фосфоротиоатом, и все уридины последовательности были модифицированы путем 2'-O-Me.

CM153: первые 2 и последние 2 нуклеотида в последовательности арРНК были соответственно модифицированы путем LNA модификации, первые 2 и последние 3 межнуклеотидные связи в последовательности арРНК были соответственно модифицированы фосфоротиоатом, и все уридины последовательности были модифицированы путем 2'-O-Me.

Таблица 12.

Название	Длина	Модификация	Последовательность
HIV2-70- CM1	55nt-c-14nt	CM1	Gm*Am*Cm*G-C-C-C-A-C-C-G-Um-G-Um- G-G-Um-Um-G-C-Um-G-Um-C-C-A-G-G-A-

			C-G-G-Um-C-C-C-G-G-C-C-Um-GC-G-A-C-A-C-Um-Um-C-G-G-C-C-C-A-G-A-G-C-Um-G-C-Um-C-C*Um*Cm*Am (SEQ ID NO: 31)
HIV2-70-CM148	55nt-c-14nt	CM148	Gmoe*Amoe*Cmoe*Gmoe-C-C-C-A-C-C-G-Um-G-Um-G-G-Um-Um-G-C-Um-G-Um-C-C-A-G-G-A-C-G-G-Um-C-C-C-G-G-C-C-Um-G-C-G-A-C-A-C-Um-Um-C-G-G-C-C-C-A-G-A-G-C-Um-G-C-Um-C*Cmoe*Umoe*Cmoe*Amoe (SEQ ID NO: 31)
HIV2-70-CM149	55nt-c-14nt	CM149	Gmoe*Amoe*Cmoe-G-C-C-C-A-C-C-G-Um-G-Um-G-G-Um-Um-G-C-Um-G-Um-C-C-A-G-G-A-C-G-G-Um-C-C-C-G-G-C-C-Um-GC-G-A-C-A-C-Um-Um-C-G-G-C-C-C-A-G-A-G-C-Um-G-C-Um-CC*Umoe*Cmoe*Amoe (SEQ ID NO: 31)
HIV2-70-CM150	55nt-c-14nt	CM150	Gmoe*Amoe-C-G-C-C-C-A-C-C-G-Um-G-Um-G-G-Um-Um-G-C-Um-G-Um-C-C-A-G-G-A-C-G-G-Um-C-C-C-G-G-C-C-Um-GC-G-A-C-A-C-Um-Um-C-G-G-C-C-C-A-G-A-G-C-Um-G-C-Um-CCU*Cmoe*Amoe (SEQ ID NO: 31)
HIV2-70-CM151	55nt-c-14nt	CM151	G+*A+*C+*G+C-C-C-A-C-C-G-Um-G-Um-G-G-Um-Um-G-C-Um-G-Um-C-C-A-G-G-A-C-G-G-Um-C-C-C-G-G-C-C-Um-GC-G-A-C-A-C-Um-Um-C-G-G-C-C-C-A-G-A-G-C-Um-G-C-Um-C*C+*U+*C+*A+ (SEQ ID NO: 31)
HIV2-70-CM152	55nt-c-14nt	CM152	G+*A+*C+G-C-C-C-A-C-C-G-Um-G-Um-G-G-Um-Um-G-C-Um-G-Um-C-C-A-G-G-A-C-G-G-Um-C-C-C-G-G-C-C-Um-GC-G-A-C-A-C-Um-Um-C-G-G-C-C-C-A-G-A-G-C-Um-G-

			C-Um-C-C*U+*C+*A+ (SEQ ID NO: 31)
HIV2-70- CM153	55nt-c-14nt	CM153	G+*A+*C-G-C-C-C-A-C-C-G-Um-G-Um-G-G -Um-Um-G-C-Um-G-Um-C-C-A-G-G-A-C-G- G-Um-C-C-C-G-G-C-C-Um-GC-G-A-C-A-C- Um-Um-C-G-G-C-C-C-A-G-A-G-C-Um-G-C- Um-C-C*U*C+*A+ (SEQ ID NO: 31)

Примечание: «m» обозначает модификацию путем 2'-O-Me на нуклеотидной рибозе; «*» обозначает модификацию фосфоротиоатом; «+» обозначает модификацию на основе блокирующей нуклеиновой кислоты (LNA). «Мое» обозначает 2'-O-(2-метоксиэтиловую) модификацию.

Пример 15: Влияние модификаций с комбинациями фосфоротиоата, 2'-O-(2-метоксиэтила) и дезоксирибонуклеотидной замены на эффективность редактирования арРНК

В этом примере предпринята попытка добавления большего количества модификаций фосфоротиоатом и 2'-O-Me к арРНК и введена дезоксирибонуклеотидная замена.

Конкретные модификации последовательности заключаются в следующем:

CM71: каждый из первых 3 и последних 3 нуклеотидов в последовательности арРНК был модифицирован путем 2'-ОМе, в то время как все уридины и все цитидины в последовательности арРНК, за исключением тех, которые находятся в нацеливающем триplete, были модифицированы путем 2'-ОМе, и первые 3 и последние 3 межнуклеотидные связи были модифицированы фосфоротиоатом.

CM94: первые 3 и последние 3 нуклеотида в последовательности арРНК, все уридины и все цитидины за исключением тех, которые находятся в нацеливающем триplete, в последовательности арРНК были модифицированы путем 2'-O-метилирования; все из первых 4 и последних 3 межнуклеотидных связей в последовательности арРНК были модифицированы фосфоротиоатом; и каждая вторая межнуклеотидная связь от 4-ой

межнуклеотидной связи с 5'-конца до 3-ей межнуклеотидной связи с 3'-конца была модифицирована фосфоротиоатом, за исключением того, что 5'-ближайшая межнуклеотидная связь каждого нуклеотида в нацеливающем триplete не является модифицированной фосфоротиоатом.

CM104: первые 3 и последние 3 нуклеотида в последовательности арРНК были модифицированы путем 2'-О-метилирования, в то время как все уридины и все цитидины в последовательности арРНК, за исключением тех, которые находятся в нацеливающем триplete, были модифицированы путем 2'-О-метилирования, и все нуклеотидные связи были модифицированы фосфоротиоатом, за исключением того, что 5'-ближайшая межнуклеотидная связь каждого нуклеотида в нацеливающем триplete не была модифицирована фосфоротиоатом.

CM105: в дополнение к содержанию всех модификаций, указанных в CM104, нацеливающий нуклеотид С был модифицирован путем дезоксирибонуклеотидной замены.

CM106: в дополнение к содержанию всех модификаций, указанных в CM104, каждый нуклеотид в нацеливающем триplete был модифицирован путем дезоксирибонуклеотидной замены.

CM107: в дополнение к содержанию всех модификаций, указанных в CM94, нацеливающий нуклеотид С был модифицирован путем дезоксирибонуклеотидной замены.

CM108: в дополнение к содержанию всех модификаций, указанных в CM94, каждый нуклеотид в нацеливающем триplete был модифицирован путем дезоксирибонуклеотидной замены.

CM114: в дополнение к содержанию всех модификаций, указанных в CM94, 5'-ближайшая межнуклеотидная связь каждого нуклеотида в нацеливающем триplete также была модифицирована фосфоротиоатом.

CM115: в дополнение к содержанию всех модификаций, указанных в CM94, 3'-ближайшая межнуклеотидная связь каждого нуклеотида в нацеливающем триplete также была модифицирована фосфоротиоатом.

CM116: в дополнение к содержанию всех модификаций, указанных в CM94,

5'-ближайшая межнуклеотидная связь 5'-ближайшего нуклеотида нацеливающего нуклеотида также была модифицирована фосфоротиоатом.

СМ117: в дополнение к содержанию всех модификаций, указанных в СМ94, 3'-ближайшая межнуклеотидная связь нацеливающего нуклеотида также была модифицирована фосфоротиоатом.

СМ118: в дополнение к содержанию всех модификаций, указанных в СМ115, нацеливающий нуклеотид С был модифицирован путем дезоксирибонуклеотидной замены.

СМ119: за исключением того, что 5'-ближайшая межнуклеотидная связь нацеливающего нуклеотида С не была модифицирована фосфоротиоатом, другие модификации были такими же, как в СМ118.

СМ120: в дополнение к содержанию всех модификаций, указанных в СМ116, нацеливающий нуклеотид С был модифицирован путем дезоксирибонуклеотидной замены.

СМ121: в дополнение к содержанию всех модификаций, указанных в СМ117, нацеливающий нуклеотид С был модифицирован путем дезоксирибонуклеотидной замены.

СМ122: в дополнение к содержанию всех модификаций, указанных в СМ114, каждый нуклеотид в нацеливающем триplete был модифицирован путем дезоксирибонуклеотидной замены.

СМ123: каждый нуклеотид в нацеливающем триplete был модифицирован путем дезоксирибонуклеотидной замены, тогда как другие модификации были такими же, как в СМ119.

СМ124: в дополнение к содержанию всех модификаций, указанных в СМ116, каждый нуклеотид в нацеливающем триplete был модифицирован путем дезоксирибонуклеотидной замены.

СМ125: в дополнение к содержанию всех модификаций, указанных в СМ117, каждый нуклеотид в нацеливающем триplete был модифицирован путем дезоксирибонуклеотидной замены.

Последовательность 55nt-c-20nt (SEQ ID NO: 26) и описания модификаций,

			*A*G*G*A*Cm*G*G*Um*Cm*Cm*Cm*G*G*Cm *Cm*Um*G*Cm*G*A*Cm*A*Cm*Um*Um*Cm* G*G*Cm-C-C-A*G*A*G*Cm*Um*G*Cm*Um*C m*Cm*Um*Cm*Am (SEQ ID NO: 31)
HIV2-70- CM105	55nt-c- 14nt	CM105	Gm*Am*Cm*G*Cm*Cm*Cm*A*Cm*Cm*G*Um* G*Um*G*G*Um*Um*G*Cm*Um*G*Um*Cm*Cm *A*G*G*A*Cm*G*G*Um*Cm*Cm*Cm*G*G*Cm *Cm*Um*G*Cm*G*A*Cm*A*Cm*Um*Um*Cm* G*G*Cm-C-Cd-A*G*A*G*Cm*Um*G*Cm*Um*C m*Cm*Um*Cm*Am (SEQ ID NO: 31)
HIV2-70- CM106	55nt-c- 14nt	CM106	Gm*Am*Cm*G*Cm*Cm*Cm*A*Cm*Cm*G*Um* G*Um*G*G*Um*Um*G*Cm*Um*G*Um*Cm*Cm *A*G*G*A*Cm*G*G*Um*Cm*Cm*Cm*G*G*Cm *Cm*Um*G*Cm*G*A*Cm*A*Cm*Um*Um*Cm* G*G*Cm-Cd-Cd-Ad*G*A*G*Cm*Um*G*Cm*Um *Cm*Cm*Um*Cm*Am (SEQ ID NO: 31)
HIV2-70- CM107	55nt-c- 14nt	CM107	Gm*Am*Cm*G*Cm-Cm*Cm-A*Cm-Cm*G-Um*G -Um*G-G*Um-Um*G-Cm*Um-G*Um-Cm*Cm-A* G-G*A-Cm*G-G*Um-Cm*Cm-Cm*G-G*Cm-Cm* Um-G*Cm-G*A-Cm*A-Cm*Um-Um*Cm-G*G-Cm -C-Cd-A*G-A*G-Cm*Um-G*Cm-Um*Cm-Cm*Um *Cm*Am (SEQ ID NO: 31)
HIV2-70- CM108	55nt-c- 14nt	CM108	Gm*Am*Cm*G*Cm-Cm*Cm-A*Cm-Cm*G-Um*G -Um*G-G*Um-Um*G-Cm*Um-G*-Um-Cm*Cm-A *G-G*-A-Cm*G-G*Um-Cm*Cm-Cm*G-G*Cm-Cm *Um-G*Cm-G*A-Cm*A-Cm*Um-Um*Cm-G*G-C m-Cd-Cd-Ad*G-A*-G-Cm*Um-G*Cm-Um*Cm-Cm *Um*Cm*Am (SEQ ID NO: 31)
HIV2-70-	55nt-c-	CM114	Gm*Am*Cm*G*Cm-Cm*Cm-A*Cm-Cm*G-Um*G

CM114	214nt		-Um*G-G*Um-Um*G-Cm*Um-G*Um-Cm*Cm-A* G-G*A-Cm*G-G*Um-Cm*Cm-Cm*G-G*Cm-Cm* Um-G*Cm-G*A-Cm*A-Cm*Um-Um*Cm-G*G-Cm *C*C*A*G-A*G-Cm*Um-G*Cm-Um*Cm-Cm*Um *Cm*Am (SEQ ID NO: 31)
HIV2-70- CM115	55nt-c- 14nt	CM115	Gm*Am*Cm*G*Cm-Cm*Cm-A*Cm-Cm*G-Um*G -Um*G-G*Um-Um*G-Cm*Um-G*Um-Cm*Cm-A* G-G*A-Cm*G-G*Um-Cm*Cm-Cm*G-G*Cm-Cm* Um-G*Cm-G*A-Cm*A-Cm*Um-Um*Cm-G*G-Cm -C*C*A*G-A*G-Cm*Um-G*Cm-Um*Cm-Cm*Um *Cm*Am (SEQ ID NO: 31)
HIV2-70- CM116	55nt-c- 14nt	CM116	Gm*Am*Cm*G*Cm-Cm*Cm-A*Cm-Cm*G-Um*G -Um*G-G*Um-Um*G-Cm*Um-G*Um-Cm*Cm-A* G-G*A-Cm*G-G*Um-Cm*Cm-Cm*G-G*Cm-Cm* Um-G*Cm-G*A-Cm*A-Cm*Um-Um*Cm-G*G-Cm *C-C-A*G-A*G-Cm*Um-G*Cm-Um*Cm-Cm*Um* Cm*Am (SEQ ID NO: 31)
HIV2-70- CM117	55nt-c- 14nt	CM117	Gm*Am*Cm*G*Cm-Cm*Cm-A*Cm-Cm*G-Um*G -Um*G-G*Um-Um*G-Cm*Um-G*Um-Cm*Cm-A* G-G*A-Cm*G-G*Um-Cm*Cm-Cm*G-G*Cm-Cm* Um-G*Cm-G*A-Cm*A-Cm*Um-Um*Cm-G*G-Cm -C-C*A*G-A*G-Cm*Um-G*Cm-Um*Cm-Cm*Um* Cm*Am (SEQ ID NO: 31)
HIV2-70- CM118	55nt-c- 14nt	CM118	Gm*Am*Cm*G*Cm-Cm*Cm-A*-Cm-Cm*G-Um* G-Um*G-G*Um-Um*G-Cm*Um-G*Um-Cm*Cm-A *G-G*A-Cm*G-G*Um-Cm*Cm-Cm*G-G*Cm-Cm* Um-G*Cm-G*A-Cm*A-Cm*Um-Um*Cm-G*G-Cm *C*Cd*A*G-A*G-Cm*Um-G*Cm-Um*Cm-Cm*U m*Cm*Am (SEQ ID NO: 31)

HIV2-70- CM119	55nt-c- 14nt	CM119	Gm*Am*Cm*G*Cm-Cm*Cm-A*Cm-Cm*G-Um*G -Um*G-G*Um-Um*G-Cm*Um-G*Um-Cm*Cm-A* G-G*A-Cm*G-G*Um-Cm*Cm-Cm*G-G*Cm-Cm* Um-G*Cm-G*A-Cm*A-Cm*Um-Um*Cm-G*G-Cm *C-Cd*A*G-A*G-Cm*Um-G*Cm-Um*Cm-Cm*U m*Cm*Am (SEQ ID NO: 31)
HIV2-70- CM120	55nt-c- 14nt	CM120	Gm*Am*Cm*G*Cm-Cm*Cm-A*Cm-Cm*G-Um*G -Um*G-G*Um-Um*G-Cm*Um-G*Um-Cm*Cm-A* G-G*A-Cm*G-G*Um-Cm*Cm-Cm*G-G*Cm-Cm* Um-G*Cm-G*A-Cm*A-Cm*Um-Um*Cm-G*G-Cm *C-Cd-A*G-A*G-Cm*Um-G*Cm-Um*Cm-Cm*Um *Cm*Am (SEQ ID NO: 31)
HIV2-70- CM121	55nt-c- 14nt	CM121	Gm*Am*Cm*G*-Cm-Cm*Cm-A*Cm-Cm*G-Um* G-Um*G-G*-Um-Um*G-Cm*Um-G*Um-Cm*Cm- A*G-G*A-Cm*-G-G*Um-Cm*Cm-Cm*G-G*Cm-C m*Um-G*Cm-G*A-Cm*A-Cm*Um-Um*Cm-G*G- Cm-C-Cd*A*-G-A*-G-Cm*Um-G*Cm-Um*Cm-C m*Um*Am (SEQ ID NO: 31)
HIV2-70- CM122	55nt-c- 14nt	CM122	Gm*Am*Cm*G*Cm-Cm*Cm-A*Cm-Cm*G-Um*G -Um*G-G*Um-Um*G-Cm*Um-G*Um-Cm*Cm-A* G-G*A-Cm*G-G*Um-Cm*Cm-Cm*G-G*Cm-Cm* Um-G*Cm-G*A-Cm*A-Cm*Um-Um*Cm-G*G-Cm *Cd*Cd*Ad*G-A*G-Cm*Um-G*Cm-Um*Cm-Cm* Um*Am (SEQ ID NO: 31)
HIV2-70- CM123	55nt-c- 14nt	CM123	Gm*Am*Cm*G*Cm-Cm*Cm-A*-Cm-Cm*G-Um* G-Um*G-G*Um-Um*G-Cm*Um-G*Um-Cm*Cm-A *G-G*A-Cm*G-G*Um-Cm*Cm-Cm*G-G*Cm-Cm* Um-G*Cm-G*-A-Cm*A-Cm*Um-Um*Cm-G*G-C m*Cd-Cd*Ad*-G-A*G-Cm*Um-G*Cm-Um*Cm-C

			m*Um*Cm*Am (SEQ ID NO: 31)
HIV2-70- CM124	55nt-c- 14nt	CM124	Gm*Am*Cm*G*Cm-Cm*Cm-A*Cm-Cm*G-Um*G -Um*G-G*Um-Um*G-Cm*Um-G*Um-Cm*Cm-A* G-G*A-Cm*-G-G*Um-Cm*Cm-Cm*G-G*Cm-Cm* Um-G*Cm-G*A-Cm*A-Cm*Um-Um*Cm-G*G-Cm *Cd-Cd-Ad*G-A*G-Cm*Um-G*Cm-Um*Cm-Cm* Um*Cm*Am (SEQ ID NO: 31)
HIV2-70- CM125	55nt-c- 14nt	CM125	Gm*Am*Cm*G*Cm-Cm*Cm-A*Cm-Cm*G-Um*G -Um*G-G*Um-Um*G-Cm*Um-G*Um-Cm*Cm-A* G-G*A-Cm*-G-G*Um-Cm*Cm-Cm*G-G*Cm-Cm* Um-G*-Cm-G*A-Cm*A-Cm*Um-Um*Cm-G*G-C m-Cd-Cd*Ad*G-A*G-Cm*Um-G*Cm-Um*Cm-Cm *Um*Cm*Am (SEQ ID NO: 31)

«m» обозначает модификацию путем 2'-O-метирирования на нуклеотидной рибозе;
«*» обозначает модификацию фосфоротиоатом; «d» обозначает модификацию путем дезоксирибонуклеотидной замены.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ направленного редактирования целевой РНК в клетке на основе технологии LEAPER, где целевая РНК содержит последовательность транскрипта гена α -L-идуронидазы (IDUA), содержащую сайт мутации гуанозина (G) в аденозин (A) (целевой аденозин), причем указанный способ включает:

введение в клетку арРНК (РНК, рекрутирующая аденозиндезаминазу) или конструкции, содержащей кодирующую последовательность арРНК, где арРНК содержит комплементарную последовательность РНК, которая гибридизуется с целевой РНК, и где арРНК путем гибридизации с целевой РНК способна рекрутировать аденозиндезаминазу, действующую на РНК (ADAR), которая дезаминирует целевой аденозин в целевой РНК.

2. Способ по п. 1, где нуклеотид (нацеливающий нуклеотид) в арРНК, который расположен напротив целевого аденозина, представляет собой цитидин (C), аденозин (A) или уридин (U).

3. Способ по п. 1 или п. 2, где целевой аденозин образует целевой триплет вместе со своим 5'-ближайшим нуклеотидом и 3'-ближайшим нуклеотидом, и указанный целевой триплет представляет собой 5'-UAG-3'.

4. Способ по любому из пп. 1-3, где 5'-ближайший нуклеотид нацеливающего нуклеотида представляет собой цитидин (C), гуанозин (G) или уридин (U).

5. Способ по любому из пп. 1-4, где 3'-ближайший нуклеотид нацеливающего нуклеотида представляет собой аденозин (A).

6. Способ по любому из пп. 1-5, где нацеливающий нуклеотид образует нацеливающий триплет вместе со своим 5'-ближайшим нуклеотидом и 3'-ближайшим нуклеотидом, и указанный нацеливающий триплет представляет собой 5'-ССА-3'.

7. Способ по любому из пп. 1-6, где длина арРНК представляет собой любое целое число нуклеотидов (nt), выбранное из 61-121 nt.

8. Способ по любому из пп. 1-7, где расстояние от нацеливающего нуклеотида арРНК до 3'-конца арРНК меньше, чем расстояние от нацеливающего нуклеотида до 5'-конца арРНК.

9. Способ по любому из пп. 1-8, где расстояние от нацеливающего нуклеотида арРНК до 3'-конца арРНК представляет собой любое целое число nt, выбранное из 9-60 nt.

10. Способ по любому из пп. 1-9, где расстояние от нацеливающего нуклеотида арРНК до 5'-конца арРНК представляет собой любое целое число nt, выбранное из 25-60 nt.

11. Способ по любому из пп. 1-10, где арРНК представляет собой арРНК, имеющую

характеристику длины, выбранную из группы, состоящей из:

55nt-c-35nt, 55nt-c-25nt, 55nt-c-24nt, 55nt-c-21nt, 55nt-c-20nt, 55nt-c-19nt, 55nt-c-18nt, 55nt-c-17nt, 55nt-c-16nt, 55nt-c-15nt, 55nt-c-14nt, 55nt-c-13nt, 55nt-c-12nt, 55nt-c-11nt, 55nt-c-10nt, 55nt-c-9nt, 50nt-c-20nt, 50nt-c-15nt и 45nt-c-20nt;

где цитидин представляет собой нацеливающий нуклеотид в арРНК, который расположен напротив целевого аденозина, и ориентация арРНК представляет собой от 5' к 3'.

12. Способ по любому из пп. 1-11, где арРНК представляет собой арРНК, имеющую характеристику длины, выбранную из группы, состоящей из: 55nt-c-20nt, 55nt-c-15nt и 55nt-c-14nt.

13. Способ по любому из пп. 1-12, где арРНК содержит одну или более химических модификаций.

14. Способ по п. 13, где химическая модификация представляет собой одну или более модификацию, выбранную из группы, состоящей из:

модификации путем 2'-О-метилирования, модификации фосфоротиоатом в межнуклеотидной связи, модификации путем дезоксирибонуклеотидной замены, LNA (блокированная нуклеиновая кислота) модификации и 2'-О-(2-метоксиэтиловой) модификации.

15. Способ по п. 13 или п. 14, где химическая модификация представляет собой одну или более модификацию, выбранную из группы, состоящей из:

- 1) модификаций путем 2'-О-метилирования в первых 2, 3, 4 или 5 нуклеотидах;
- 2) модификаций путем 2'-О-метилирования в последних 2, 3, 4, или 5 нуклеотидах;
- 3) модификаций путем 2'-О-метилирования во всех цитидинах за исключением тех, которые находятся в нацеливающем триplete;
- 4) 2'-О-(2-метоксиэтиловых) модификаций в первых 2, 3 или 4 нуклеотидах;
- 5) 2'-О-(2-метоксиэтиловых) модификаций в последних 2, 3 или 4 нуклеотидах;
- 6) модификаций путем дезоксирибонуклеотидной замены первых 2, 3 или 4 нуклеотидов;
- 7) модификаций путем дезоксирибонуклеотидной замены последних 2, 3 или 4 нуклеотидов;
- 8) модификаций фосфоротиоатом в первых 1, 2, 3, 4 или 5 межнуклеотидных связях;
- 9) модификаций фосфоротиоатом в последних 1, 2, 3, 4 или 5 межнуклеотидных связях;
- 10) модификаций фосфоротиоатом во всех межнуклеотидных связях за

исключением того, что одна или более из 5'- или 3'-ближайших межнуклеотидных связей каждого из нуклеотидов в нацеливающем триплете не являются модифицированными фосфоротиоатом; и

11) модификаций фосфоротиоатом в межнуклеотидных связях с интервалом в 1, 2, 3 или 4 нуклеотида за исключением того, что одна или более из 5'- или 3'-ближайших межнуклеотидных связей каждого из нуклеотидов в нацеливающем триплете не являются модифицированными фосфоротиоатом.

16. Способ по любому из пп. 13-15, где арРНК содержит любую химическую модификацию, выбранную из группы, состоящей из:

СМ0: первые 3 и последние 3 нуклеотида в последовательности арРНК соответственно модифицированы путем 2'-О-метилирования, и первые 3 и последние 3 межнуклеотидные связи в последовательности арРНК соответственно модифицированы фосфоротиоатом;

СМ1: первые 3 и последние 3 нуклеотида в последовательности арРНК соответственно модифицированы путем 2'-О-метилирования, первые 3 и последние 3 межнуклеотидные связи в последовательности арРНК соответственно модифицированы фосфоротиоатом и все уридины последовательности модифицированы путем 2'-О-метилирования;

СМ2: первые 3 и последние 3 нуклеотида в последовательности арРНК соответственно модифицированы путем 2'-О-метилирования, и первые 3 и последние 3 межнуклеотидные связи в последовательности арРНК соответственно модифицированы фосфоротиоатом; и 3'-ближайший нуклеотид нацеливающего нуклеотида модифицирован путем 2'-О-метилирования;

СМ3: первые 3 и последние 3 нуклеотида в последовательности арРНК соответственно модифицированы путем 2'-О-метилирования, и первые 3 и последние 3 межнуклеотидные связи в последовательности арРНК соответственно модифицированы фосфоротиоатом; и 5'-ближайший нуклеотид нацеливающего нуклеотида модифицирован путем 2'-О-метилирования;

СМ4: первые 3 и последние 3 нуклеотида в последовательности арРНК соответственно модифицированы путем 2'-О-метилирования, и первые 3 и последние 3 межнуклеотидные связи в последовательности арРНК соответственно модифицированы фосфоротиоатом; и 3'-ближайшая межнуклеотидная связь каждого из трех оснований в нацеливающем триплете соответственно модифицирована фосфоротиоатом;

СМ6: первые 5 и последние 5 нуклеотидов в последовательности арРНК соответственно модифицированы путем 2'-О-метилирования, и первые 5 и последние 5

межнуклеотидных связей в последовательности арРНК соответственно модифицированы фосфоротиоатом;

СМ148: первые 4 и последние 4 нуклеотида в последовательности арРНК соответственно модифицированы 2'-О-(2-метоксиэтилом), первые 3 и последние 4 межнуклеотидные связи в последовательности арРНК соответственно модифицированы фосфоротиоатом, и все уридины последовательности модифицированы путем 2'-О-Ме;

СМ149: первые 3 и последние 3 нуклеотида в последовательности арРНК соответственно модифицированы 2'-О-(2-метоксиэтилом), первые 2 и последние 3 межнуклеотидные связи в последовательности арРНК соответственно модифицированы фосфоротиоатом, и все уридины последовательности модифицированы путем 2'-О-Ме;

СМ150: первые 2 и последние 2 нуклеотида в последовательности арРНК соответственно модифицированы 2'-О-(2-метоксиэтилом), первая 1 и последние 2 межнуклеотидные связи в последовательности арРНК соответственно модифицированы фосфоротиоатом, и все уридины последовательности модифицированы путем 2'-О-Ме;

СМ151: первые 4 и последние 4 нуклеотида в последовательности арРНК соответственно модифицированы путем LNA модификации, первые 3 и последние 4 межнуклеотидные связи в последовательности арРНК соответственно модифицированы фосфоротиоатом, и все уридины последовательности модифицированы путем 2'-О-Ме;

СМ152: первые 3 и последние 3 нуклеотида в последовательности арРНК соответственно модифицированы путем LNA модификации, первые 2 и последние 3 межнуклеотидные связи в последовательности арРНК соответственно модифицированы фосфоротиоатом, и все уридины последовательности модифицированы путем 2'-О-Ме;

СМ153: первые 2 и последние 2 нуклеотида в последовательности арРНК соответственно модифицированы путем LNA модификации, первые 2 и последние 3 межнуклеотидные связи в последовательности арРНК соответственно модифицированы фосфоротиоатом, и все уридины последовательности модифицированы путем 2'-О-Ме;

СМ94: первые 3 и последние 3 нуклеотида в последовательности арРНК, все уридины и все цитидины за исключением тех, которые находятся в нацеливающем триplete, в последовательности арРНК модифицированы путем 2'-О-метилирования; все из первых 4 и последних 3 межнуклеотидных связей в последовательности арРНК модифицированы фосфоротиоатом; и каждая вторая межнуклеотидная связь от 4-ой межнуклеотидной связи с 5'-конца до 3-ей межнуклеотидной связи с 3'-конца модифицирована фосфоротиоатом, за исключением того, что 5'-ближайшая межнуклеотидная связь каждого нуклеотида в нацеливающем триplete не является модифицированной фосфоротиоатом;

СМ119: первые 3 и последние 3 нуклеотида в последовательности арРНК, все уридины и все цитидины в последовательности арРНК за исключением тех, которые находятся в нацеливающем триplete, модифицированы путем 2'-О-метилирования; все из первых 4 и последних 3 межнуклеотидных связей в последовательности арРНК модифицированы фосфоротиоатом; каждая вторая межнуклеотидная связь от 4-ой межнуклеотидной связи с 5'-конца до 3'-ближайшей межнуклеотидной связи нацеливающего нуклеотида и от 3-ей межнуклеотидной связи с 3'-конца до 3'-ближайшего нуклеотида нацеливающего нуклеотида модифицирована фосфоротиоатом; и нацеливающий нуклеотид заменен дезоксирибонуклеотидом;

СМ120: первые 3 и последние 3 нуклеотида в последовательности арРНК, все уридины и все цитидины в последовательности арРНК за исключением тех, которые находятся в нацеливающем триplete, модифицированы путем 2'-О-метилирования; первые 4 и последние 3 межнуклеотидные связи в последовательности арРНК модифицированы фосфоротиоатом; каждая вторая межнуклеотидная связь от 4-ой межнуклеотидной связи с 5'-конца до 5'-ближайшей межнуклеотидной связи нацеливающего нуклеотида и от 3-ей межнуклеотидной связи с 3'-конца до 3'-ближайшей межнуклеотидной связи нацеливающего нуклеотида модифицирована фосфоротиоатом; и нацеливающий нуклеотид заменен дезоксирибонуклеотидом;

СМ123: первые 3 и последние 3 нуклеотида в последовательности арРНК, все уридины и все цитидины в последовательности арРНК за исключением тех, которые находятся в нацеливающем триplete, модифицированы путем 2'-О-метилирования; первые 4 и последние 3 межнуклеотидные связи модифицированы фосфоротиоатом; каждая вторая межнуклеотидная связь от 4-ой межнуклеотидной связи с 5'-конца до 3'-ближайшей межнуклеотидной связи нацеливающего нуклеотида и от 3-ей межнуклеотидной связи с 3'-конца до 3'-ближайшего нуклеотида нацеливающего нуклеотида модифицирована фосфоротиоатом; и каждый нуклеотид в нацеливающем триplete заменен дезоксирибонуклеотидом;

СМ125: первые 3 и последние 3 нуклеотида в последовательности арРНК, все уридины и все цитидины в последовательности арРНК за исключением тех, которые находятся в нацеливающем триplete, модифицированы путем 2'-О-метилирования; первые 4 и последние 3 межнуклеотидные связи и 3'-ближайшие нуклеотидные связи нацеливающего нуклеотида модифицированы фосфоротиоатом; каждая вторая межнуклеотидная связь от 4-ой межнуклеотидной связи с 5'-конца до 5'-ближайшего нуклеотида из 5'-ближайшего нуклеотида нацеливающего нуклеотида и от 3-ей межнуклеотидной связи с 3'-конца до 3'-ближайшего нуклеотида нацеливающего

нуклеотида модифицирована фосфоротиоатом; и каждый нуклеотид в нацеливающем триплете заменен дезоксирибонуклеотидом.

17. Способ по любому из пп. 1-16, где сайт мутации гуанозина (G) в аденозин (A), на который нацелена арРНК, представляет собой сайт мутации в NM_000203.4(IDUA)-с.1205G>A (р.Trp402Ter) или соответствующий ему сайт мутации в геноме пациента с синдромом Гурлера.

18. Способ по любому из пп. 1-17, где арРНК содержит любую последовательность, выбранную из группы, состоящей из:

1)Gm* Am*Cm-G*Cm-Cm*Cm-A*Cm-Cm*G-Um*G-Um*G-G*Um-Um*G-Cm*Um-G*Um-Cm*Cm-A*G-G*A-Cm*G-G*Um-Cm*Cm-Cm*G-G*Cm-Cm*Um-G*Cm-G*A-Cm*A-Cm*Um-Um*Um*G*G-Cm-C-A*G-A*G-Cm*Um-G*Cm-Um*Um-Cm*Um*Um*Am (SEQ ID NO: 31);

2)Gm* Am*Cm-G*Cm-Cm*Cm-A*-Cm-Cm*G-Um*G-Um*G-G*Um-Um*G-Cm*Um-G*Um-Cm*Cm-A*G-G*A-Cm*G-G*Um-Cm*Cm-Cm*G-G*Cm-Cm*Um-G*Cm-G*-A-Cm*A-Cm*Um-Um*Um*G*G-Cm*Cd-Cd*Ad*-G-A*G-Cm*Um-G*Cm-Um*Um-Cm*Um*Um*Am (SEQ ID NO: 31);

3)Gm* Am*Cm-G*Cm-Cm*Cm-A*Cm-Cm*G-Um*G-Um*G-G*Um-Um*G-Cm*Um-G*Um-Cm*Cm-A*G-G*A-Cm*-G-G*Um-Cm*Cm-Cm*G-G*Cm-Cm*Um-G*-Cm-G*A-Cm*A-Cm*Um-Um*Um*G*G-Cm-Cd-Cd*Ad*G-A*G-Cm*Um-G*Cm-Um*Um-Cm*Um*Um*Am (SEQ ID NO: 31);

4)Gmoe*Amoe*Cmoe*Gmoe-C-C-C-A-C-C-G-Um-G-Um-G-G-Um-Um-G-C-Um-G-Um-C-C-A-G-G-A-C-G-G-Um-C-C-C-G-G-C-C-Um-GC-G-A-C-A-C-Um-Um-C-G-G-C-C-A-G-A-G-C-Um-G-C-Um-C*Cmoe*Umoe*Cmoe*Amoe (SEQ ID NO: 31) или

5)G+*A+*C+*G+C-C-C-A-C-C-G-Um-G-Um-G-G-Um-Um-G-C-Um-G-Um-C-C-A-G-G-A-C-G-G-Um-C-C-C-G-G-C-C-Um-GC-G-A-C-A-C-Um-Um-C-G-G-C-C-C-A-G-A-G-C-Um-G-C-Um-C*C+*U+*C+*A+ (SEQ ID NO: 31);

где * обозначает модификацию фосфоротиоатом, m обозначает модификацию путем 2'-О-метилирования, тое обозначает 2'-О-(2-метоксиэтиловую) модификацию, + обозначает LNA модификацию, и d обозначает модификацию путем дезоксирибонуклеотидной замены.

19. Способ по любому из пп. 1-18, где арРНК вводят в клетки с помощью любого способа, выбранного из группы, состоящей из: электропорации, трансфекции липосом, доставки экзосом или доставки липидных наночастиц (LNP).

20. Способ по любому из пп. 1-19, где количество арРНК при однократном введении в клетки составляет от 5 до 160 нМ.

21. Способ по любому из пп. 1-20, где для введения арРНК в клетки осуществляют несколько введений, и интервал между двумя ближайшими введениями составляет 21 день или менее.

22. Способ предотвращения или лечения синдрома Гурлера, включающий коррекцию патогенной мутации G>A синдрома Гурлера с использованием способа по любому из пп. 1-21.

23. Сконструированная арРНК, которая используется для направленного редактирования целевой РНК в клетке на основе технологии LEAPER, где целевая РНК содержит последовательность транскрипта гена α -L-идуронидазы (IDUA), содержащую сайт мутации гуанозина (G) в аденозин (A) (целевой аденозин), арРНК содержит комплементарную последовательность РНК, которая гибридизуется с целевой РНК, и арРНК путем гибридизации с целевой РНК способна рекрутировать аденозиндезаминазу, действующую на РНК (ADAR), которая дезаминирует целевой аденозин в целевой РНК, причем сайт мутации гуанозина (G) в аденозин (A), на который нацелена арРНК, представляет собой сайт мутации NM_000203.4(IDUA)-c.1205G>A (p.Trp402Ter) или соответствующий ему сайт мутации в геноме пациента с синдромом Гурлера.

24. АрРНК по п. 23, представляющая собой арРНК, имеющую характеристику длины, выбранную из группы, состоящей из:

55nt-c-35nt, 55nt-c-25nt, 55nt-c-24nt, 55nt-c-21nt, 55nt-c-20nt, 55nt-c-19nt, 55nt-c-18nt, 55nt-c-17nt, 55nt-c-16nt, 55nt-c-15nt, 55nt-c-14nt, 55nt-c-13nt, 55nt-c-12nt, 55nt-c-11nt, 55nt-c-10nt, 55nt-c-9nt, 50nt-c-20nt, 50nt-c-15nt и 45nt-c-20nt;

где цитидин представляет собой нацеливающий нуклеотид в арРНК, который расположен напротив целевого аденозина, и ориентация арРНК представляет собой от 5' к 3'.

25. АрРНК по п. 23 или п. 24, содержащая одну или более химических модификаций.

26. АрРНК по любому из пп. 23-25, где химическая модификация представляет собой одну или более модификаций, выбранных из группы, состоящей из:

модификации путем 2'-О-метилирования, модификации фосфоротиоатом в межнуклеотидной связи, модификации путем дезоксирибонуклеотидной замены, LNA модификации и 2' О-(2-метоксиэтиловой) модификации.

27. АрРНК по любому из пп. 23-26, где химическая модификация представляет собой одну или более модификаций, выбранных из группы, состоящей из:

1) модификаций путем 2'-О-метилирования в первых 2, 3, 4 или 5 нуклеотидах;

2) модификаций путем 2'-О-метилирования в последних 2, 3, 4, или 5 нуклеотидах;

3) модификаций путем 2'-О-метилирования во всех цитидинах за исключением тех, которые находятся в нацеливающем триплете;

4) 2'-О-(2-метоксиэтиловых) модификаций в первых 2, 3 или 4 нуклеотидах;

5) 2'-О-(2-метоксиэтиловых) модификаций в последних 2, 3 или 4 нуклеотидах;

6) модификаций путем дезоксирибонуклеотидной замены первых 2, 3 или 4 нуклеотидов;

7) модификаций путем дезоксирибонуклеотидной замены последних 2, 3 или 4 нуклеотидов;

8) модификаций фосфоротиоатом в первых 1, 2, 3, 4 или 5 межнуклеотидных связях;

9) модификаций фосфоротиоатом в последних 1, 2, 3, 4 или 5 межнуклеотидных связях;

10) модификаций фосфоротиоатом во всех межнуклеотидных связях за исключением того, что одна или более из 5'- или 3'-ближайших межнуклеотидных связей каждого из нуклеотидов в нацеливающем триплете не являются модифицированными фосфоротиоатом; и

11) модификаций фосфоротиоатом в межнуклеотидных связях с интервалом в 1, 2, 3, или 4 нуклеотида за исключением того, что одна или более из 5'- или 3'-ближайших межнуклеотидных связей каждого из нуклеотидов в нацеливающем триплете не являются модифицированными фосфоротиоатом.

28. арРНК по любому из пп. 23-27, содержащая любую химическую модификацию, выбранную из группы, состоящей из:

СМ0: первые 3 и последние 3 нуклеотида в последовательности арРНК соответственно модифицированы путем 2'-О-метилирования, и первые 3 и последние 3 межнуклеотидные связи в последовательности арРНК соответственно модифицированы фосфоротиоатом;

СМ1: первые 3 и последние 3 нуклеотида в последовательности арРНК соответственно модифицированы путем 2'-О-метилирования, первые 3 и последние 3 межнуклеотидные связи в последовательности арРНК соответственно модифицированы фосфоротиоатом и все уридины последовательности модифицированы путем 2'-О-метилирования;

СМ2: первые 3 и последние 3 нуклеотида в последовательности арРНК соответственно модифицированы путем 2'-О-метилирования, и первые 3 и последние 3 межнуклеотидные связи в последовательности арРНК соответственно модифицированы фосфоротиоатом; и 3'-ближайший нуклеотид нацеливающего нуклеотида модифицирован

путем 2'-О-метилирования;

СМ3: первые 3 и последние 3 нуклеотида в последовательности арРНК соответственно модифицированы путем 2'-О-метилирования, и первые 3 и последние 3 межнуклеотидные связи в последовательности арРНК соответственно модифицированы фосфоротиоатом; и 5'-ближайший нуклеотид нацеливающего нуклеотида модифицирован путем 2'-О-метилирования;

СМ4: первые 3 и последние 3 нуклеотида в последовательности арРНК соответственно модифицированы путем 2'-О-метилирования, и первые 3 и последние 3 межнуклеотидные связи в последовательности арРНК соответственно модифицированы фосфоротиоатом; и 3'-ближайшая межнуклеотидная связь каждого из трех оснований в нацеливающем триplete соответственно модифицирована фосфоротиоатом;

СМ6: первые 5 и последние 5 нуклеотидов в последовательности арРНК соответственно модифицированы путем 2'-О-метилирования, и первые 5 и последние 5 межнуклеотидных связей в последовательности арРНК соответственно модифицированы фосфоротиоатом;

СМ148: первые 4 и последние 4 нуклеотида в последовательности арРНК соответственно модифицированы 2'-О-(2-метоксиэтилом), первые 3 и последние 4 межнуклеотидные связи в последовательности арРНК соответственно модифицированы фосфоротиоатом, и все уридины последовательности модифицированы путем 2'-О-Ме;

СМ149: первые 3 и последние 3 нуклеотида в последовательности арРНК соответственно модифицированы 2'-О-(2-метоксиэтилом), первые 2 и последние 3 межнуклеотидные связи в последовательности арРНК соответственно модифицированы фосфоротиоатом, и все уридины последовательности модифицированы путем 2'-О-Ме;

СМ150: первые 2 и последние 2 нуклеотида в последовательности арРНК соответственно модифицированы 2'-О-(2-метоксиэтилом), первая 1 и последние 2 межнуклеотидные связи в последовательности арРНК соответственно модифицированы фосфоротиоатом, и все уридины последовательности модифицированы путем 2'-О-Ме;

СМ151: первые 4 и последние 4 нуклеотида в последовательности арРНК соответственно модифицированы путем LNA модификации, первые 3 и последние 4 межнуклеотидные связи в последовательности арРНК соответственно модифицированы фосфоротиоатом, и все уридины последовательности модифицированы путем 2'-О-Ме;

СМ152: первые 3 и последние 3 нуклеотида в последовательности арРНК соответственно модифицированы путем LNA модификации, первые 2 и последние 3 межнуклеотидные связи в последовательности арРНК соответственно модифицированы фосфоротиоатом, и все уридины последовательности модифицированы путем 2'-О-Ме;

CM153: первые 2 и последние 2 нуклеотида в последовательности арРНК соответственно модифицированы путем LNA модификации, первые 2 и последние 3 межнуклеотидные связи в последовательности арРНК соответственно модифицированы фосфоротиоатом, и все уридины последовательности модифицированы путем 2'-О-Ме;

CM94: первые 3 и последние 3 нуклеотида в последовательности арРНК, все уридины и все цитидины за исключением тех, которые находятся в нацеливающем триplete, в последовательности арРНК модифицированы путем 2'-О-метилирования; все из первых 4 и последних 3 межнуклеотидных связей в последовательности арРНК модифицированы фосфоротиоатом; и каждая вторая межнуклеотидная связь от 4-ой межнуклеотидной связи с 5'-конца до 3-ей межнуклеотидной связи с 3'-конца модифицирована фосфоротиоатом, за исключением того, что 5'-ближайшая межнуклеотидная связь каждого нуклеотида в нацеливающем триplete не является модифицированной фосфоротиоатом;

CM119: первые 3 и последние 3 нуклеотида в последовательности арРНК, все уридины и все цитидины в последовательности арРНК за исключением тех, которые находятся в нацеливающем триplete, модифицированы путем 2'-О-метилирования; все из первых 4 и последних 3 межнуклеотидных связей в последовательности арРНК модифицированы фосфоротиоатом; каждая вторая межнуклеотидная связь от 4-ой межнуклеотидной связи с 5'-конца до 3'-ближайшей межнуклеотидной связи нацеливающего нуклеотида и от 3-ей межнуклеотидной связи с 3'-конца до 3'-ближайшего нуклеотида нацеливающего нуклеотида модифицирована фосфоротиоатом; и нацеливающий нуклеотид заменен дезоксирибонуклеотидом;

CM120: первые 3 и последние 3 нуклеотида в последовательности арРНК, все уридины и все цитидины в последовательности арРНК за исключением тех, которые находятся в нацеливающем триplete, модифицированы путем 2'-О-метилирования; первые 4 и последние 3 межнуклеотидные связи в последовательности арРНК модифицированы фосфоротиоатом; каждая вторая межнуклеотидная связь от 4-ой межнуклеотидной связи с 5'-конца до 5'-ближайшей межнуклеотидной связи нацеливающего нуклеотида и от 3-ей межнуклеотидной связи с 3'-конца до 3'-ближайшей межнуклеотидной связи нацеливающего нуклеотида модифицирована фосфоротиоатом; и нацеливающий нуклеотид заменен дезоксирибонуклеотидом;

CM123: первые 3 и последние 3 нуклеотида в последовательности арРНК, все уридины и все цитидины в последовательности арРНК за исключением тех, которые находятся в нацеливающем триplete, модифицированы путем 2'-О-метилирования; первые 4 и последние 3 межнуклеотидные связи модифицированы фосфоротиоатом;

каждая вторая межнуклеотидная связь от 4-ой межнуклеотидной связи с 5'-конца до 3'-ближайшей межнуклеотидной связи нацеливающего нуклеотида и от 3-ей межнуклеотидной связи с 3'-конца до 3'-ближайшего нуклеотида нацеливающего нуклеотида модифицирована фосфоротиоатом; и каждый нуклеотид в нацеливающем триплете заменен дезоксирибонуклеотидом;

CM125: первые 3 и последние 3 нуклеотида в последовательности арРНК, все уридины и все цитидины в последовательности арРНК за исключением тех, которые находятся в нацеливающем триплете, модифицированы путем 2'-О-метилирования; первые 4 и последние 3 межнуклеотидные связи и 3'-ближайшие нуклеотидные связи нацеливающего нуклеотида модифицированы фосфоротиоатом; каждая вторая межнуклеотидная связь от 4-ой межнуклеотидной связи с 5'-конца до 5'-ближайшего нуклеотида из 5'-ближайшего нуклеотида нацеливающего нуклеотида и от 3-ей межнуклеотидной связи с 3'-конца до 3'-ближайшего нуклеотида нацеливающего нуклеотида модифицирована фосфоротиоатом; и каждый нуклеотид в нацеливающем триплете заменен дезоксирибонуклеотидом.

29. АрРНК по любому из пп.23-28, содержащая любую последовательность, выбранную из группы, состоящей из:

1)Gm*Am*Cm*G*Cm-Cm*A*Cm-Cm*G-Um*G-Um*G-G*Um-Um*G-Cm*Um-G*Um-Cm*Cm-A*G-G*A-Cm*G-G*Um-Cm*Cm-Cm*G-G*Cm-Cm*Um-G*Cm-G*A-Cm*A-Cm*Um-Um*Um*G*G-Cm-C-C-A*G-A*G-Cm*Um-G*Cm-Um*Um*Um*G-Cm*Am (SEQ ID NO: 31);

2)Gm*Am*Cm*G*Cm-Cm*A*-Cm-Cm*G-Um*G-Um*G-G*Um-Um*G-Cm*Um-G*Um-Cm*Cm-A*G-G*A-Cm*G-G*Um-Cm*Cm-Cm*G-G*Cm-Cm*Um-G*Cm-G*-A-Cm*A-Cm*Um-Um*Um*G*G-Cm*Cd-Cd*Ad*-G-A*G-Cm*Um-G*Cm-Um*Um*Um*G-Cm*Am (SEQ ID NO: 31);

3)Gm*Am*Cm*G*Cm-Cm*A*Cm-Cm*G-Um*G-Um*G-G*Um-Um*G-Cm*Um-G*Um-Cm*Cm-A*G-G*A-Cm*-G-G*Um-Cm*Cm-Cm*G-G*Cm-Cm*Um-G*-Cm-G*A-Cm*A-Cm*Um-Um*Um*G*G-Cm-Cd-Cd*Ad*G-A*G-Cm*Um-G*Cm-Um*Um*Um*G-Cm*Am (SEQ ID NO: 31);

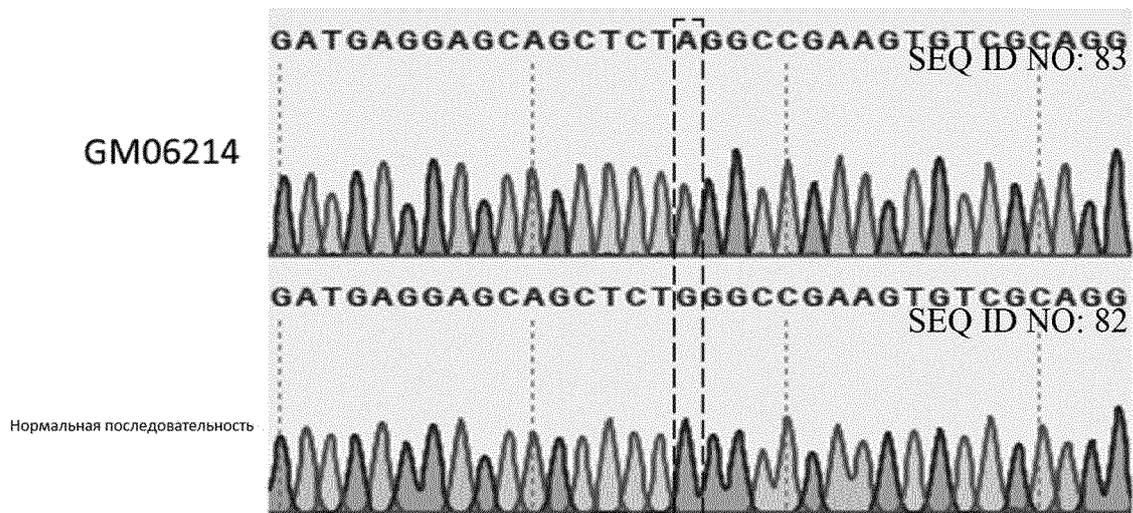
4)Gmoe*Amoe*Umoe*Gmoe-C-C-C-A-C-C-G-Um-G-Um-G-G-Um-Um-G-C-Um-G-Um-C-C-A-G-G-A-C-G-G-Um-C-C-C-G-G-C-C-Um-GC-G-A-C-A-C-Um-Um-C-G-G-C-C-C-A-G-A-G-C-Um-G-C-Um-C*Umoe*Umoe*Umoe*Amoe (SEQ ID NO: 31) или

5)G+*A+*C+*G+C-C-C-A-C-C-G-Um-G-Um-G-G-Um-Um-G-C-Um-G-Um-C-C-A-G-G-A-C-G-G-Um-C-C-C-G-G-C-C-Um-GC-G-A-C-A-C-Um-Um-C-G-G-C-C-C-A-G-A-G-C-Um-G-C-Um-C*U+*C+*A+ (SEQ ID NO: 31);

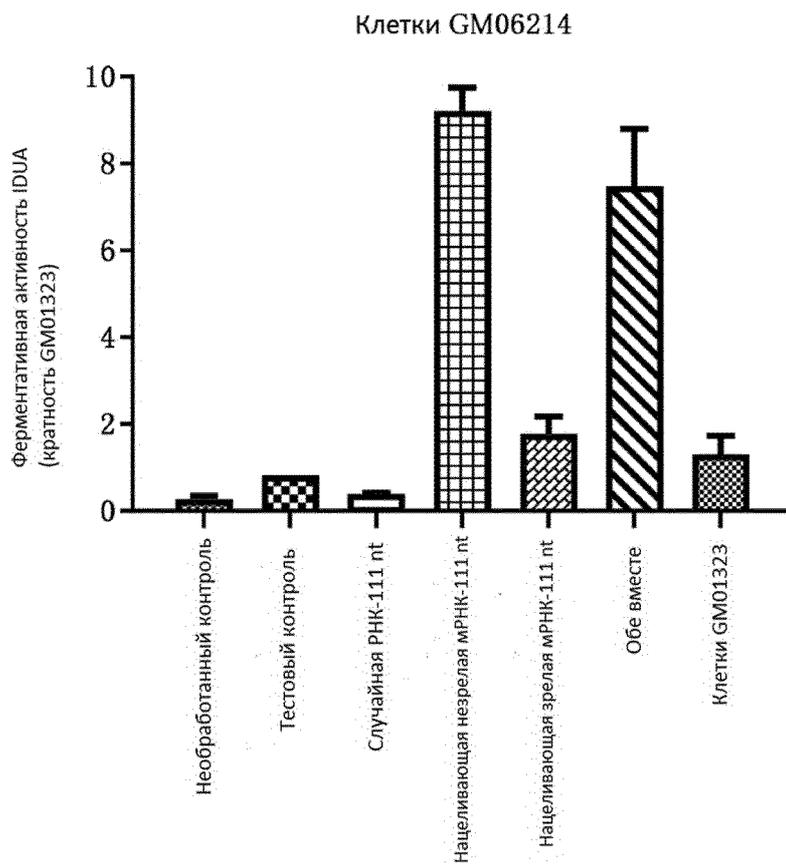
где * обозначает модификацию фосфоротиоатом, m обозначает модификацию путем 2'-O-метилирования, тое обозначает 2'-O-(2-метоксиэтиловую) модификацию, + обозначает LNA модификацию, и d обозначает модификацию путем дезоксирибонуклеотидной замены.

30. Конструкция, содержащая кодирующую последовательность арРНК по п. 23 или п. 24.

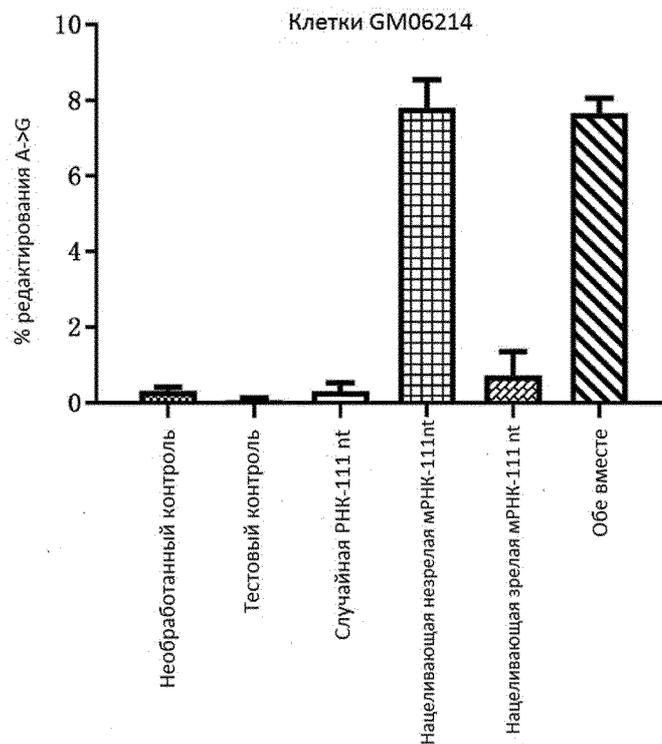
31. Композиция, липосома, экзосома, липидная наночастица, клетка, библиотека или набор, содержащие арРНК по любому из пп. 23-29 или конструкцию по п. 30.



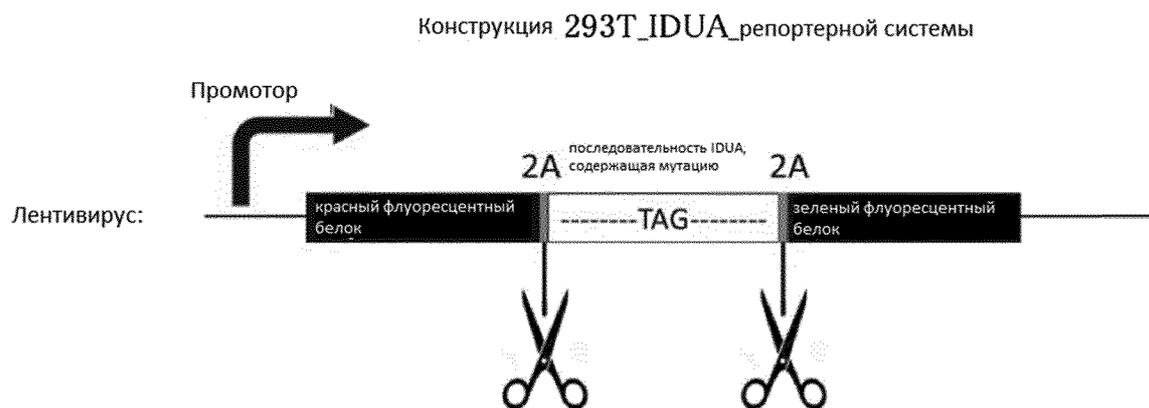
ФИГУРА 1



ФИГУРА 2А



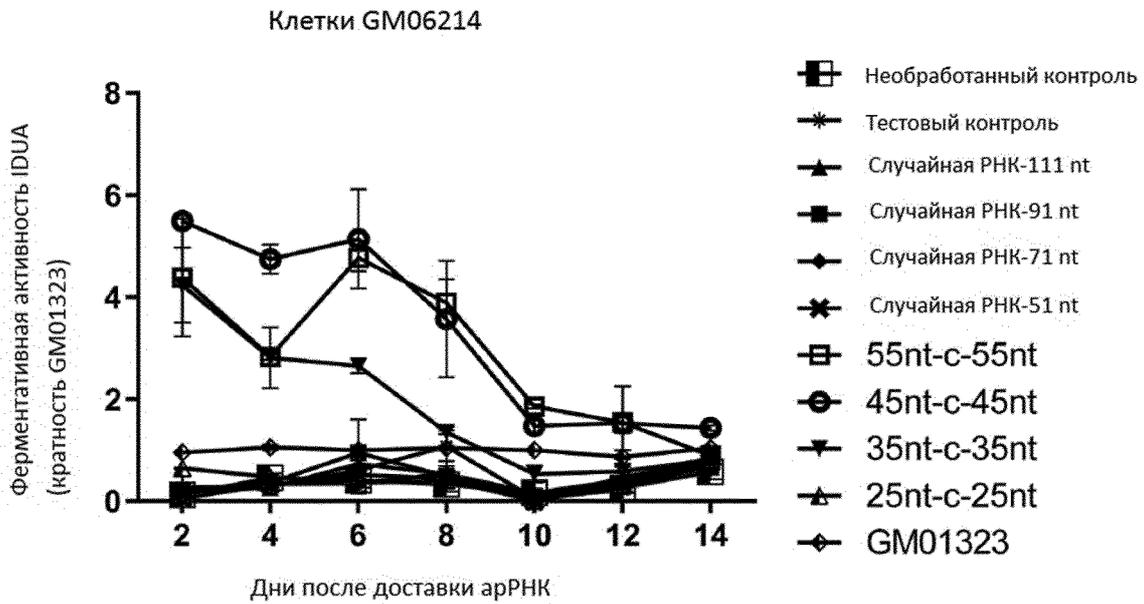
ФИГУРА 2В



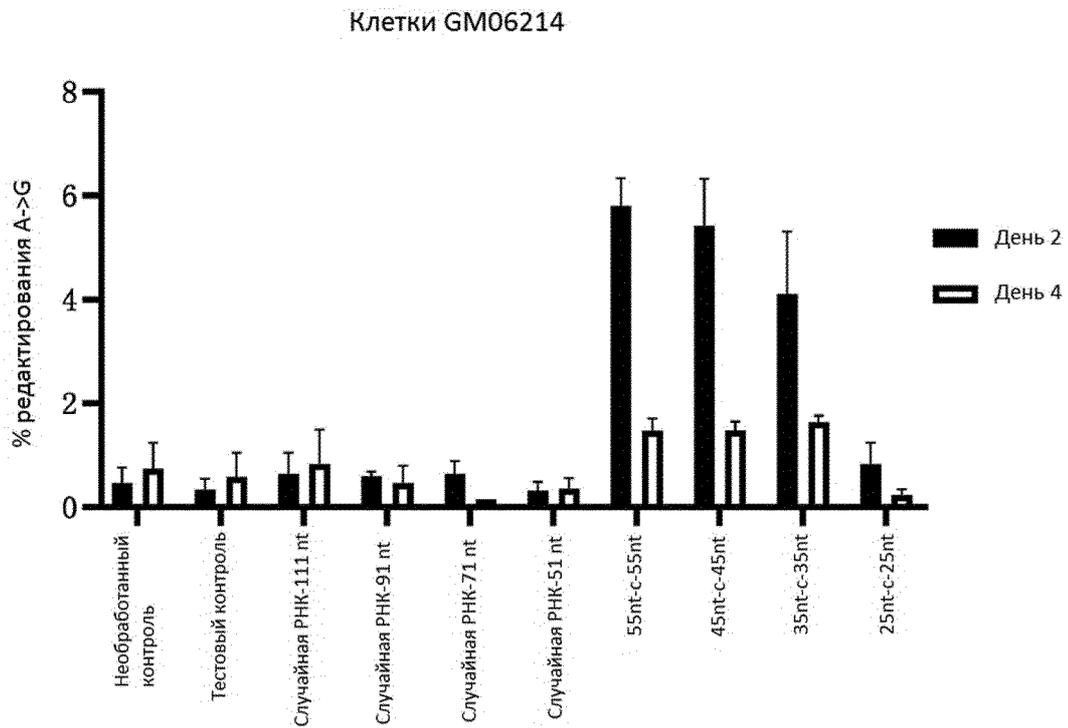
ФИГУРА 3А



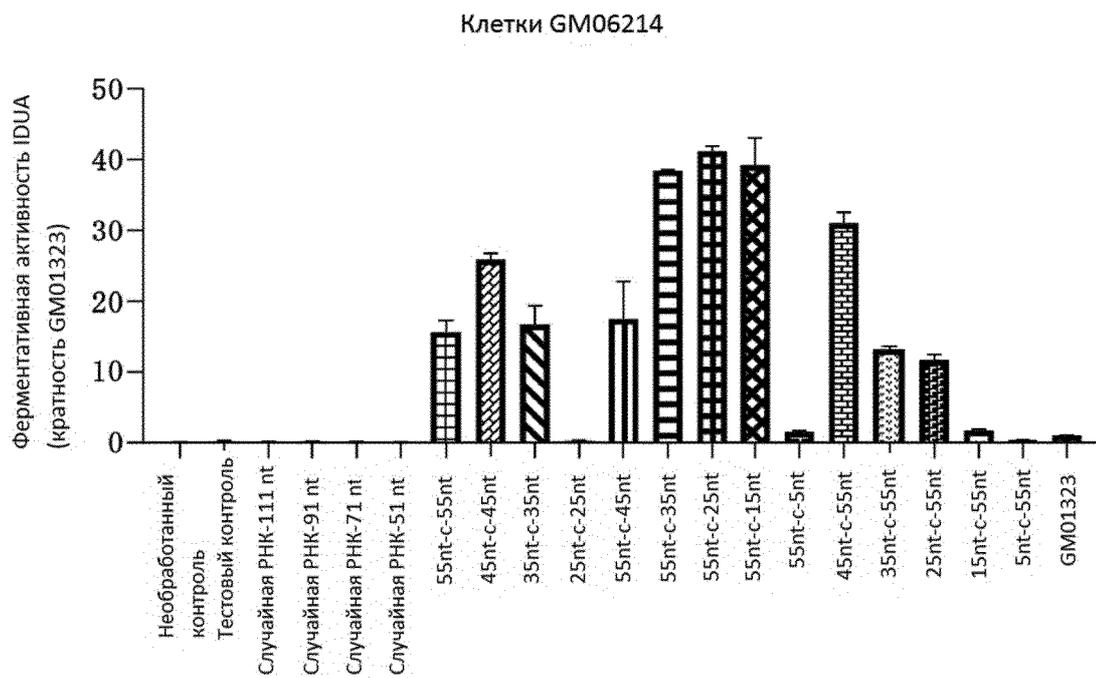
ФИГУРА 3В



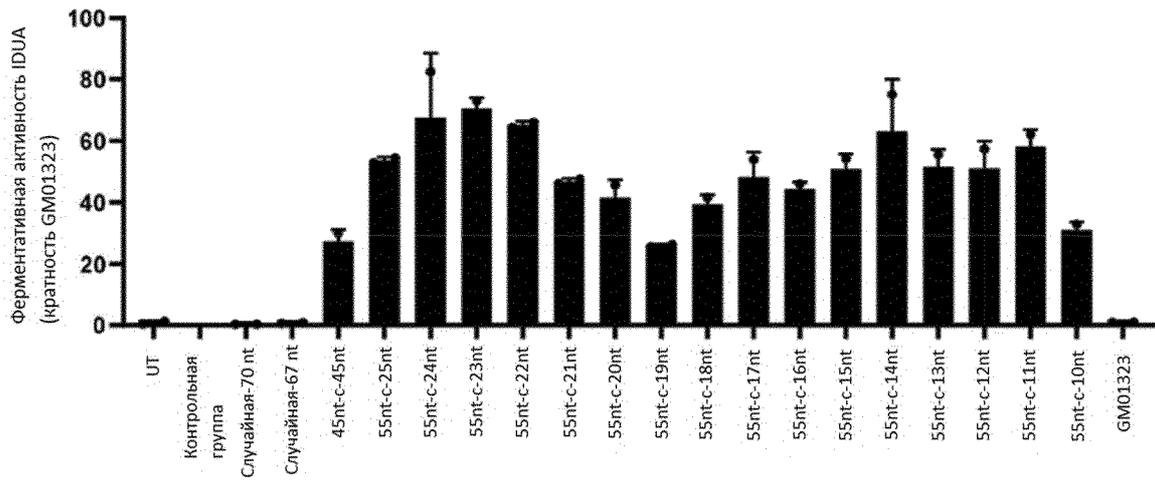
ФИГУРА 4А



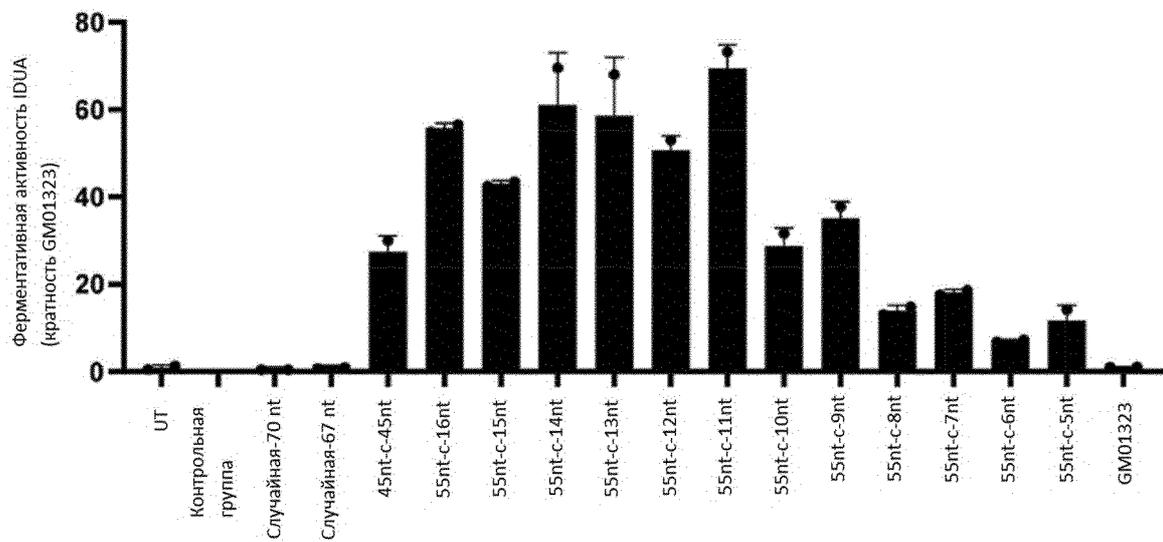
ФИГУРА 4В



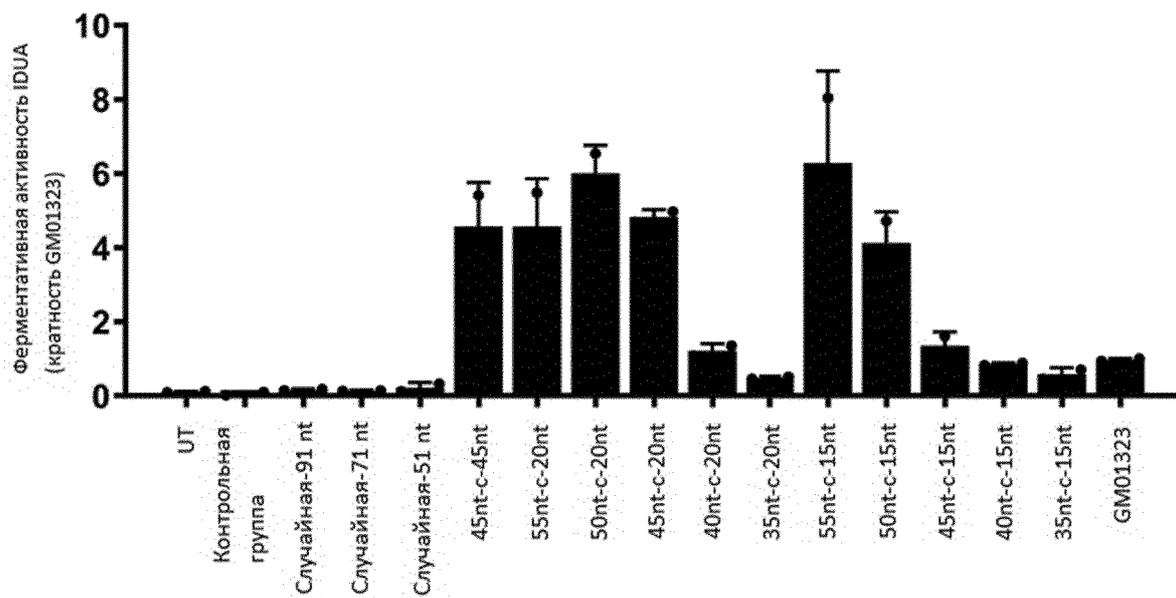
ФИГУРА 5



ФИГУРА 6А

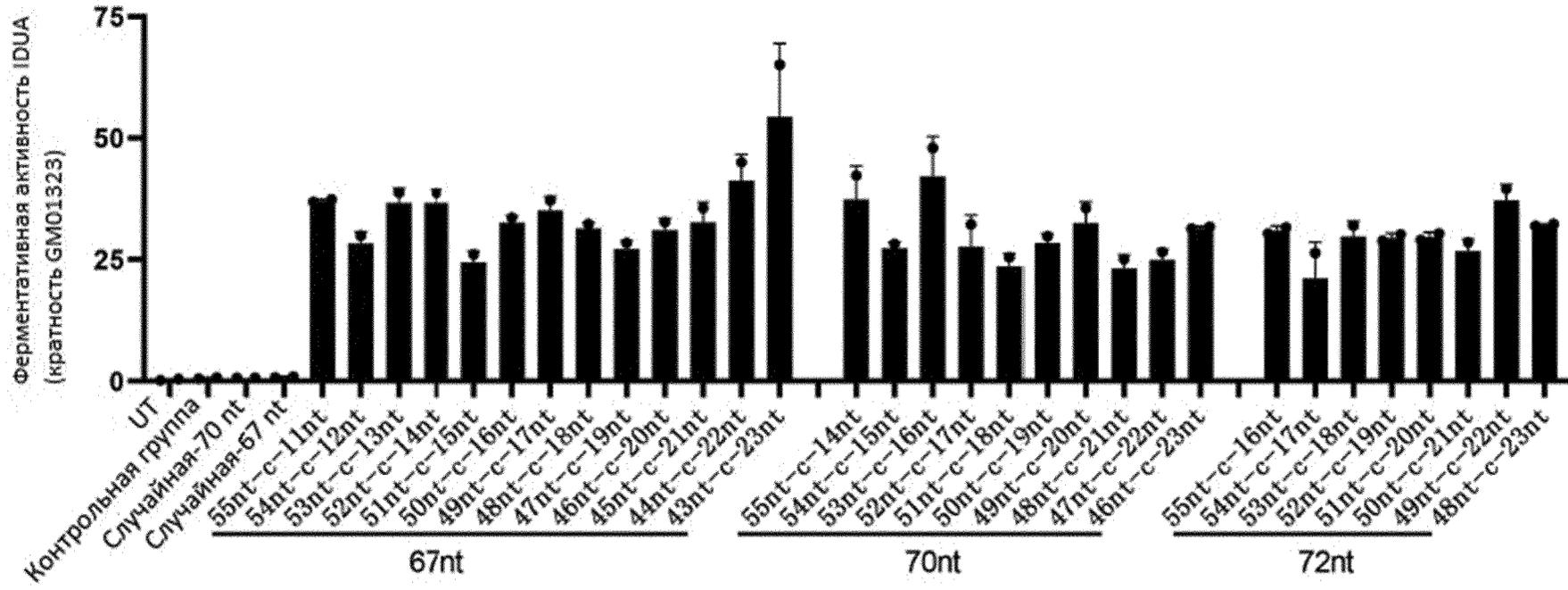


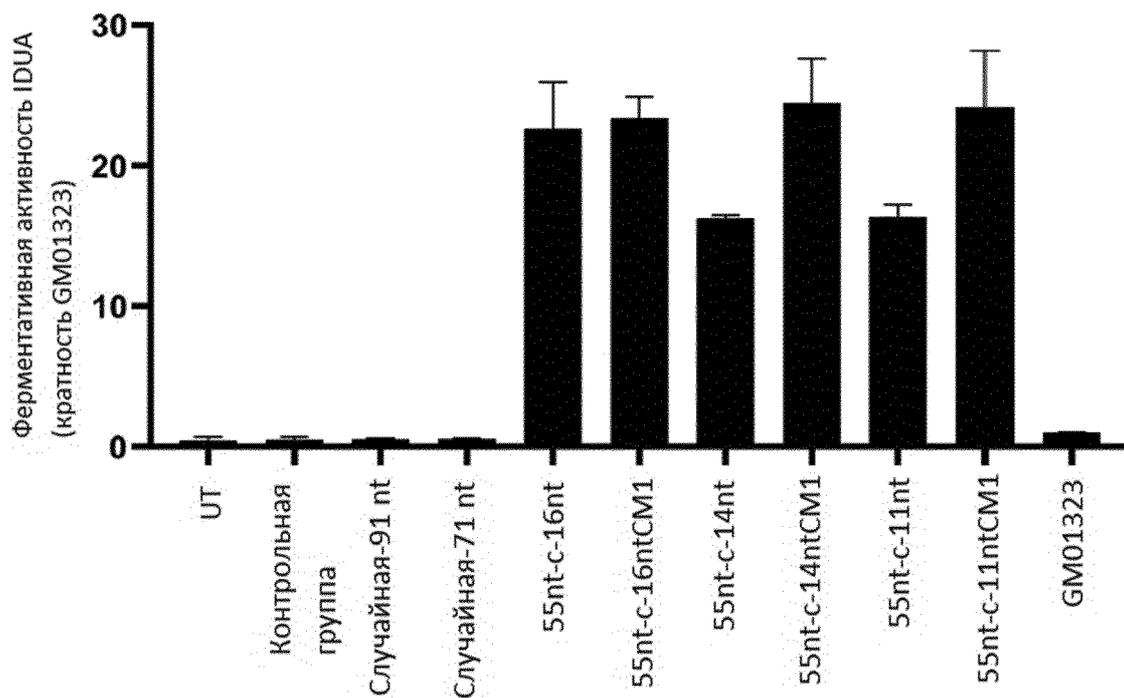
ФИГУРА 6В



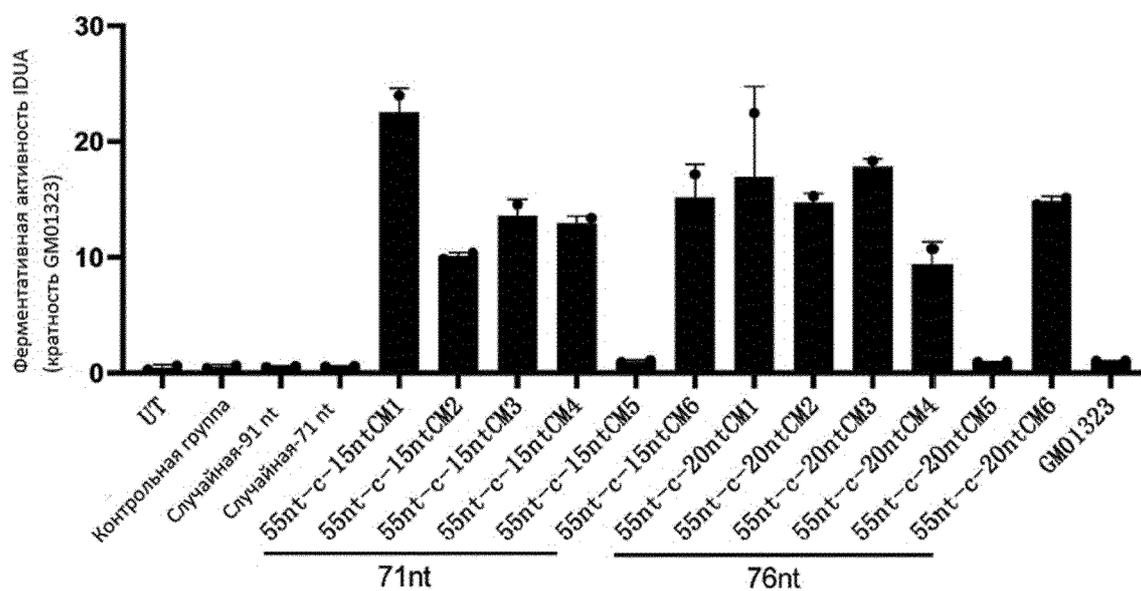
ФИГУРА 7

ФИГУРА 8

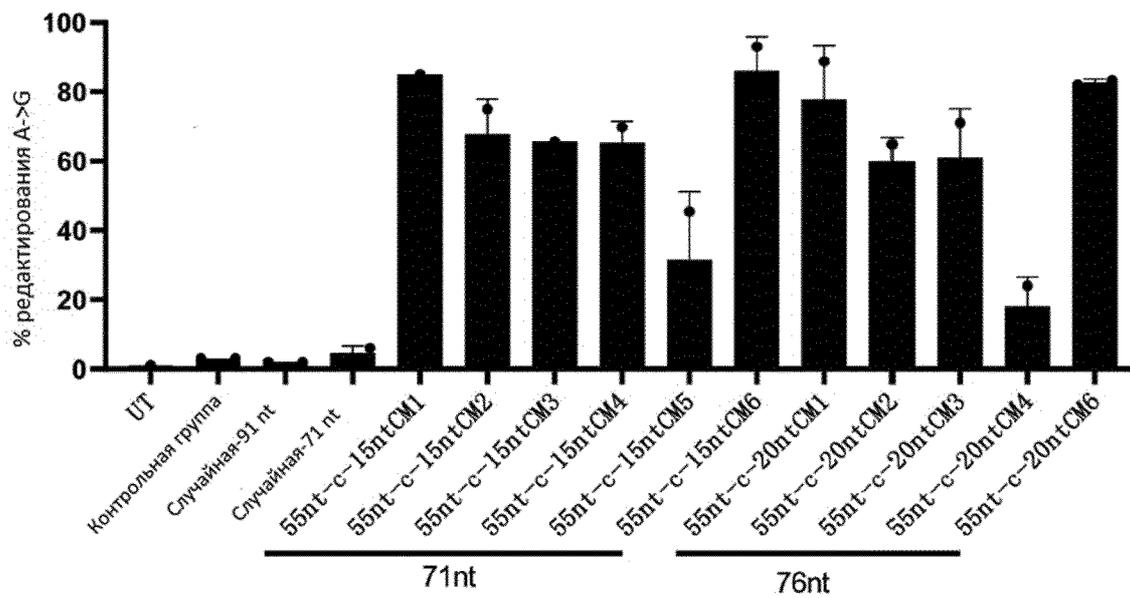




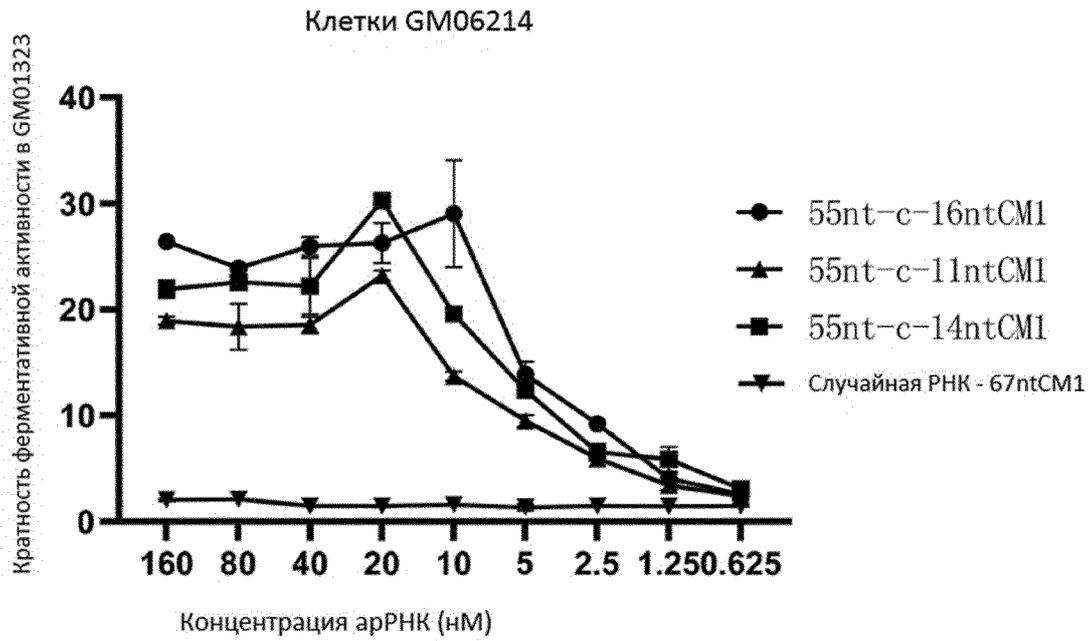
ФИГУРА 9А



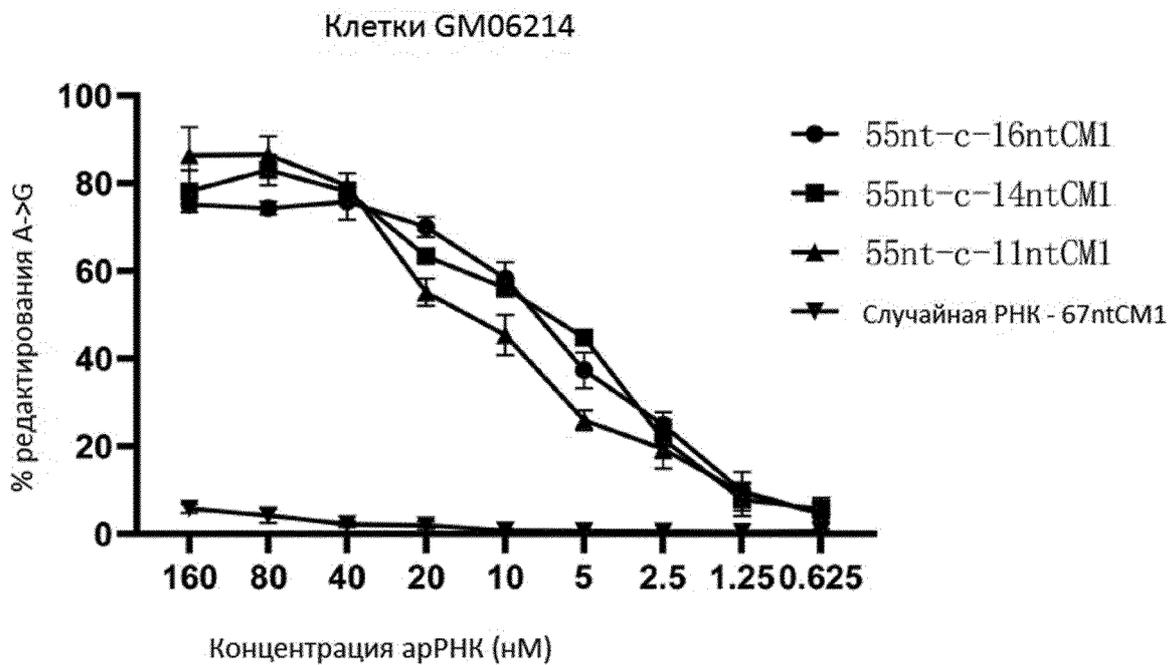
ФИГУРА 9В



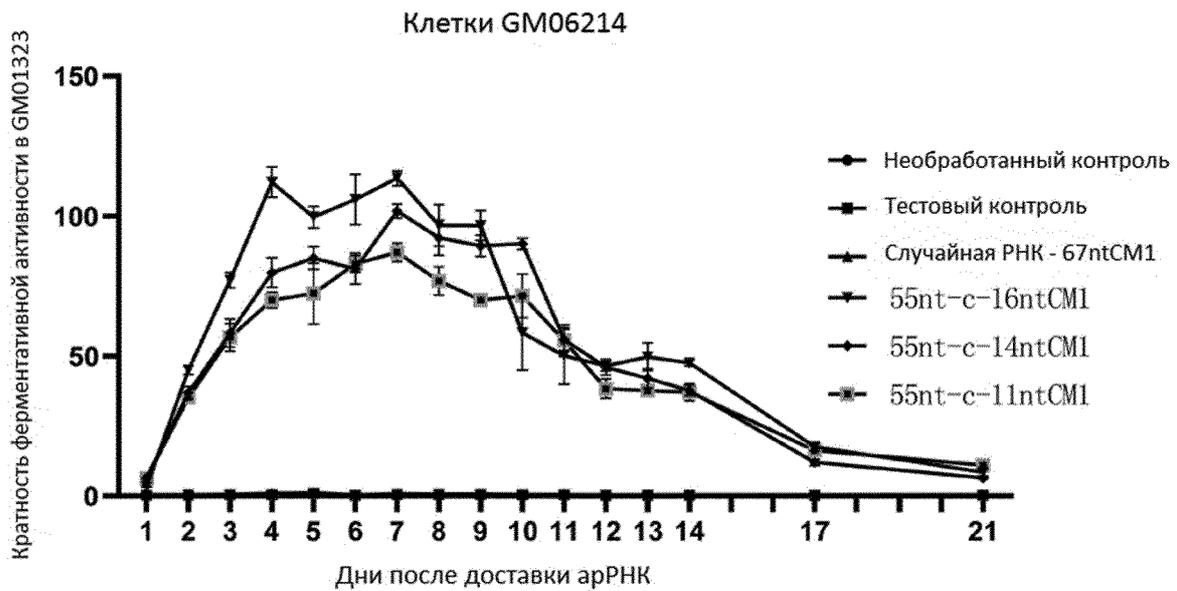
ФИГУРА 9С



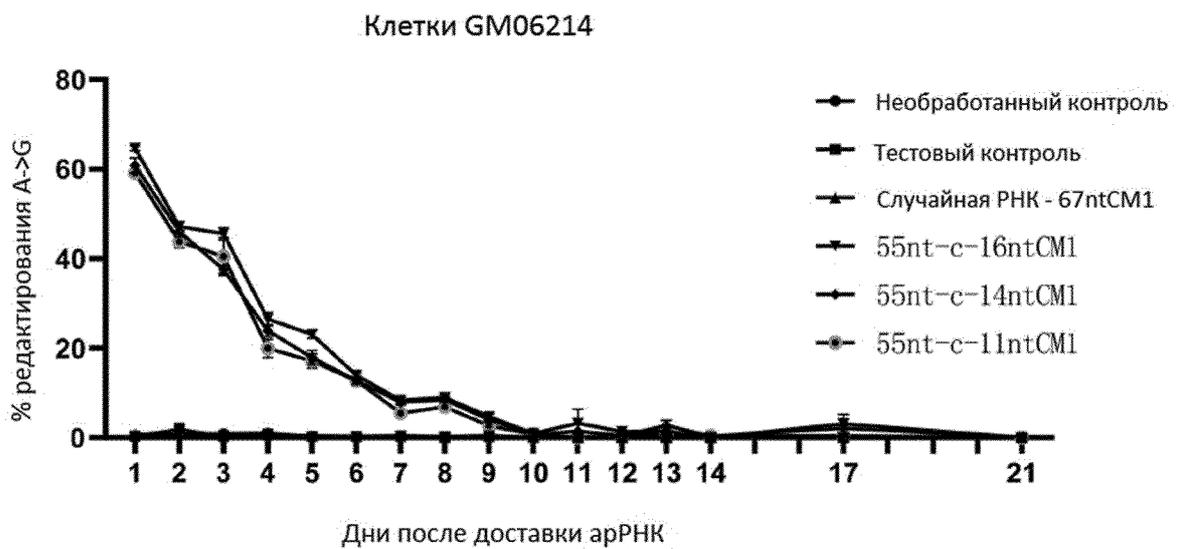
ФИГУРА 10А



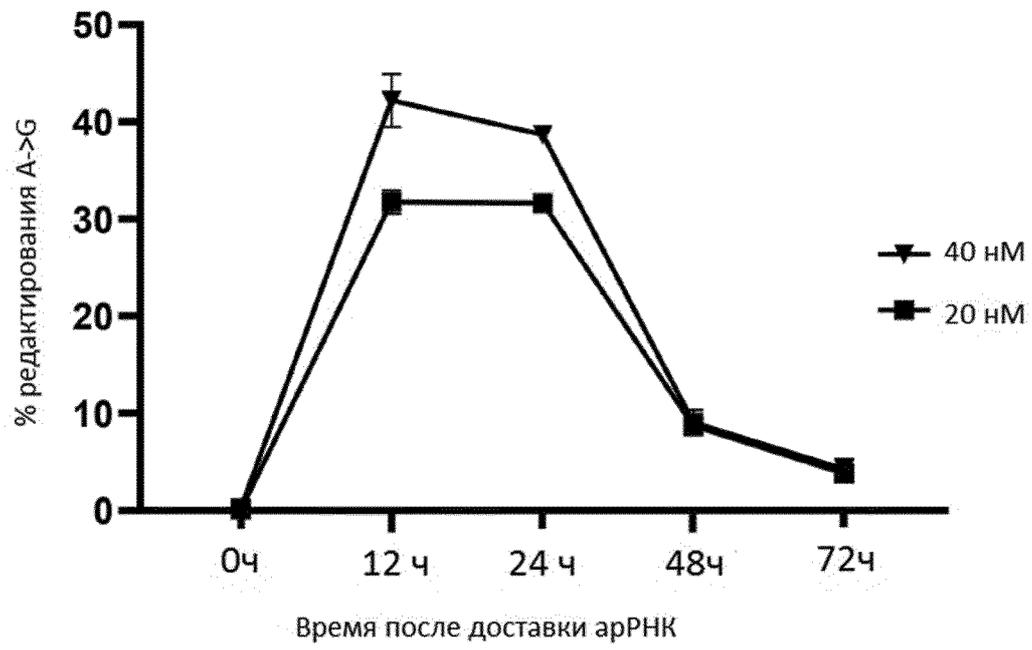
ФИГУРА 10В



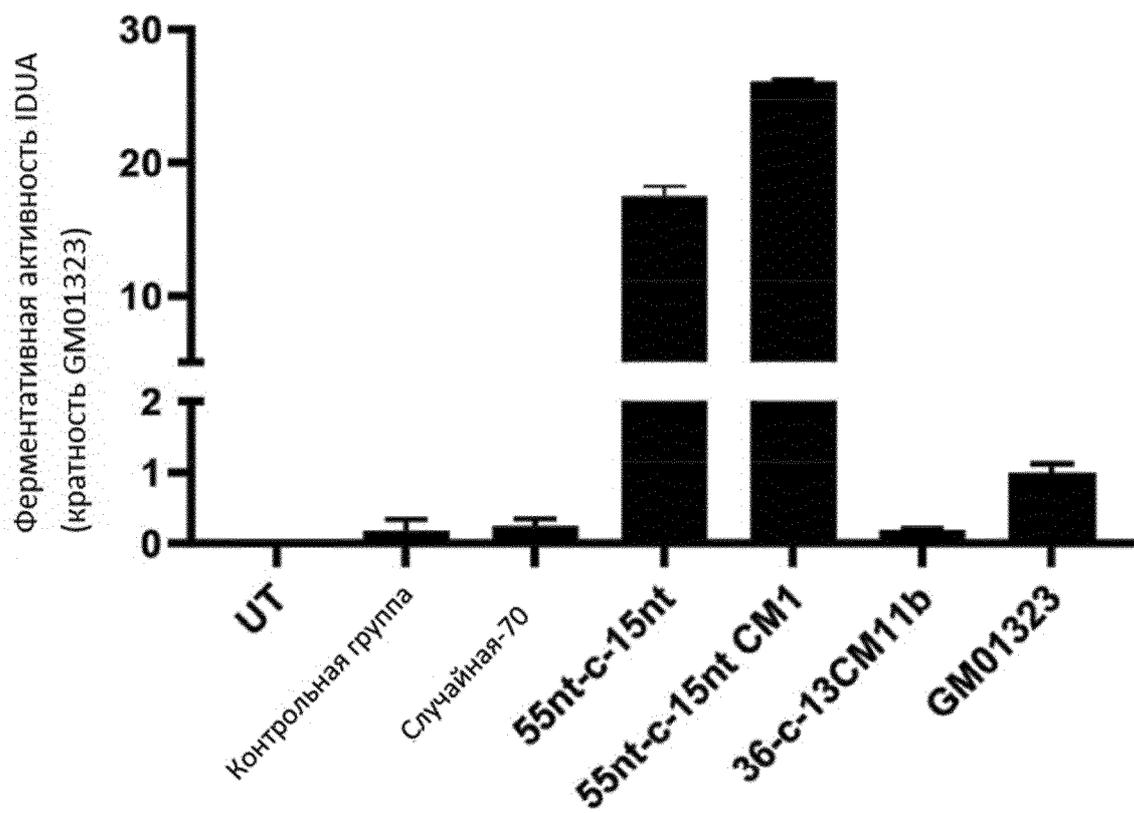
ФИГУРА 11А



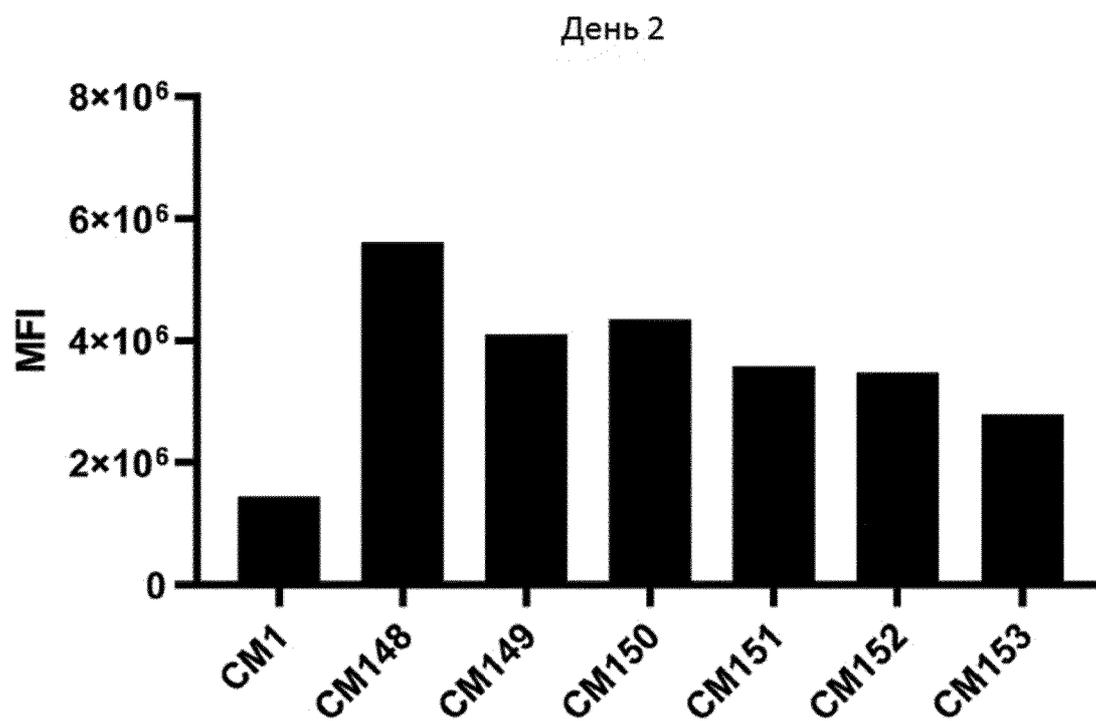
ФИГУРА 11В



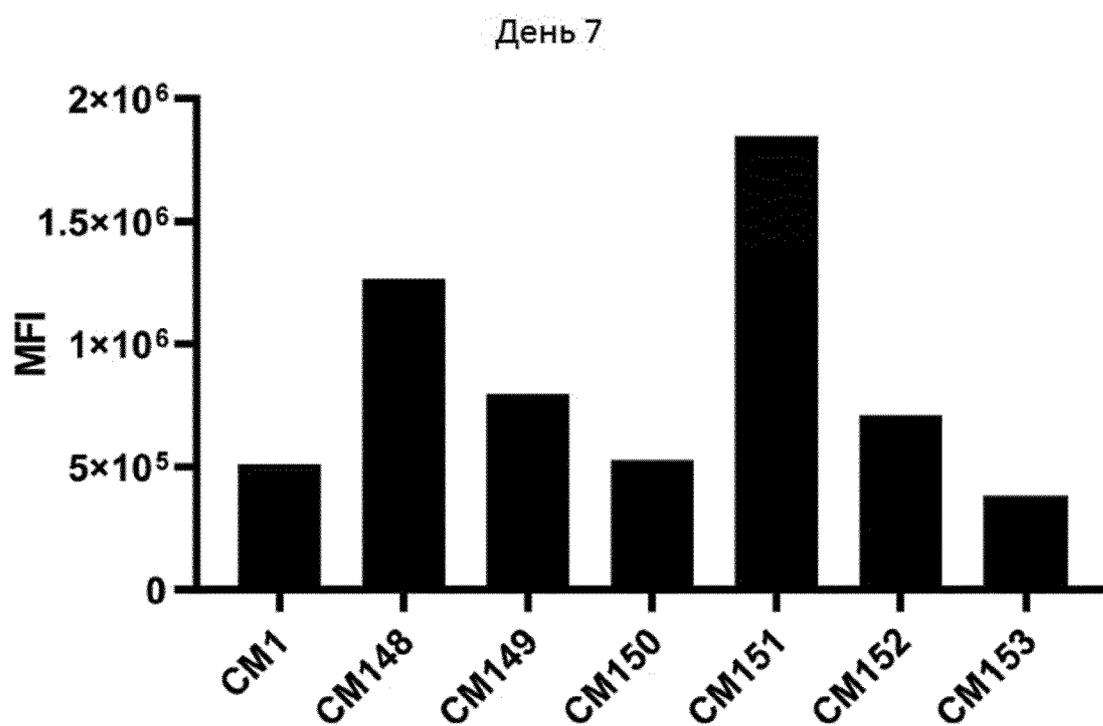
ФИГУРА 12



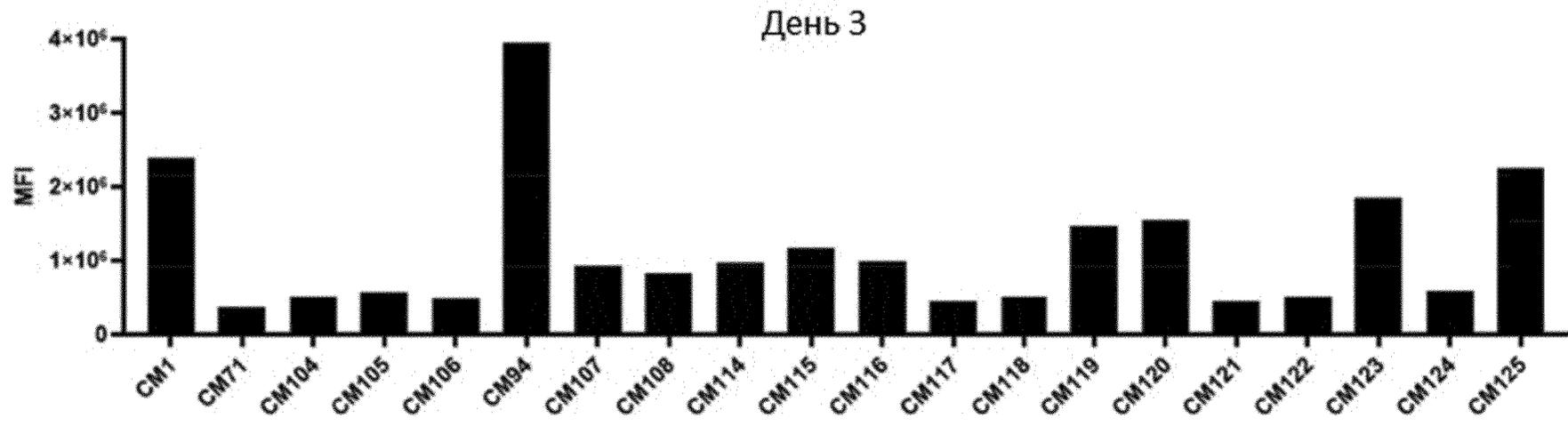
ФИГУРА 13



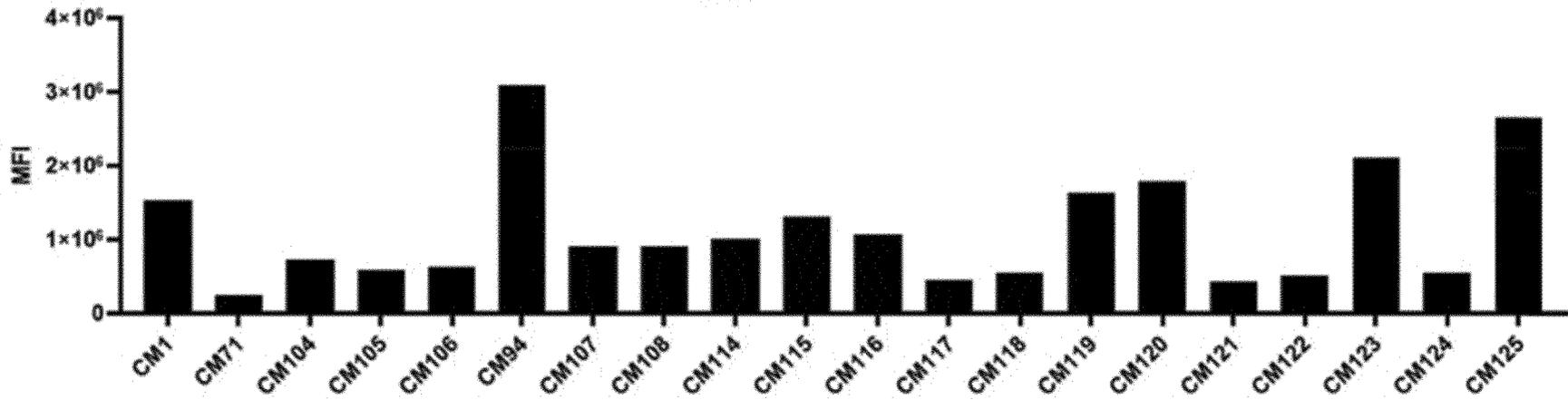
ФИГУРА 14А



ФИГУРА 14В



День 5



ФИГУРА 15В

ФИГУРА 15С

