



**(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

**(45)** Дата публикации и выдачи патента  
**2023.12.28**

**(51)** Int. Cl. *C12N 15/11* (2006.01)

**(21)** Номер заявки  
**201892507**

**(22)** Дата подачи заявки  
**2017.06.22**

**(54) ОДНОЦЕПОЧЕЧНЫЕ РЕДАКТИРУЮЩИЕ РНК ОЛИГОНУКЛЕОТИДЫ**

**(31)** 1610923.3; 1614669.8; 1702755.8;  
1706292.8

**(32)** 2016.06.22; 2016.08.30; 2017.02.21;  
2017.04.20

**(33)** GB

**(43)** 2019.05.31

**(86)** PCT/EP2017/065467

**(87)** WO 2017/220751 2017.12.28

**(71)(73)** Заявитель и патентовладелец:  
**ПРОКЬЮЭР ТЕРАПЬЮТИКС П  
БИ.ВИ. (NL)**

**(72)** Изобретатель:  
**Турунен Жанне Юха, Дэ Бруйжн  
Петра Гезьена, Кляйн Барт, Рэдис  
Роксана Симона, Ван Синт Фиег  
Ленка (NL)**

**(74)** Представитель:  
**Строкова О.В., Угрюмов В.М. (RU)**

**(56)** WOOLF T.M. ET AL.: "Toward the therapeutic editing of mutated RNA sequences", PROCEEDINGS NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES PNAS, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, US, vol. 92, 1 August 1995 (1995-08-01), p. 8298-8302, XP000574995, ISSN: 0027-8424, DOI: 10.1073/PNAS.92.18.8298, cited in the application, p. 8299; fig. 2, the whole document, p. 8300, right-hand column; fig. 3A

M.F. MONTIEL-GONZALEZ ET AL.: "Correction of mutations within the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator by site-directed RNA editing", PROCEEDINGS NATIONAL

ACADEMY OF SCIENCES PNAS, vol. 110, № 45, 9 October 2013 (2013-10-09), p. 18285-18290, XP055404008, US, ISSN: 0027-8424, DOI: 10.1073/pnas.1306243110, cited in the application oligonucleotide № 9; table S1, the whole document

M.F. SCHNEIDER ET AL.: "Optimal guideRNAs for re-directing deaminase activity of hADAR1 and hADAR2 in trans", NUCLEIC ACIDS RESEARCH, vol. 42, № 10, 17 April 2014 (2014-04-17), p. e87-e87, XP055260764, ISSN: 0305-1048, DOI: 10.1093/nar/gku272, the whole document

MARIUS F. SCHNEIDER ET AL.: "Supporting Information: Optimal guideRNAs for re-directing deaminase activity of hADAR1 and hADAR2 in trans", 1 January 2014 (2014-01-01), XP055329590, retrieved from the Internet: URL: <http://nar.oxfordjournals.org/content/suppl/2014/04/15/gku272.DC1/nar-03496-met-g-2013-File007.pdf> [retrieved on 2016-12-15], the whole document

STAFFORST THORSTEN ET AL.: "An RNA-deaminase conjugate selectively repairs point mutations", ANGEWANDTE CHEMIE (INTERNATIONAL EDITION), WILEY - VCH VERLAG GMBH & CO, DE, vol. 51, № 44, 29 October 2012 (2012-10-29), p. 11166-11169, XP002765253, ISSN: 1521-3773, the whole document

STAFFORST T. and SCHNEIDER M.: "Supporting Information: An RNA-Deaminase conjugate selectively repairs point mutations", 1 January 2012 (2012-01-01), XP55404065, retrieved from the Internet: URL: [http://onlinelibrary.wiley.com/store/10.1002/anie.201206489/asset/supinfo/anie\\_201206489\\_sm\\_mis\\_cellaneous\\_information.pdf?v=1&s=9eaa5de75c3e5d0bfa2aeb8dd31476be45125b95](http://onlinelibrary.wiley.com/store/10.1002/anie.201206489/asset/supinfo/anie_201206489_sm_mis_cellaneous_information.pdf?v=1&s=9eaa5de75c3e5d0bfa2aeb8dd31476be45125b95) [retrieved on 2017-09-05], the whole document

**(57)** Изобретение относится к антисмысловым олигонуклеотидам, которые способны приводить к специфическому редактированию целевого нуклеотида (аденозина) в целевой РНК в эукариотической клетке, причем указанный олигонуклеотид сам по себе не образует внутримолекулярной шпильки или структуры петля-на-стебле и причем указанный олигонуклеотид содержит цитидин (некомплементарный нуклеотид) или уридин в положении, противоположном целевому аденозину, подлежащему редактированию в целевой области РНК.

### Область техники, к которой относится настоящее изобретение

Настоящее изобретение относится к области медицины. Более конкретно, оно относится к области редактирования РНК, в соответствии с чем на последовательность РНК нацелено воздействуют одноцепочечным антисмысловым олигонуклеотидом для специфической коррекции мутации в последовательности РНК.

### Предшествующий уровень техники настоящего изобретения

Редактирование РНК представляет собой естественный процесс, посредством которого эукариотические клетки изменяют последовательность своих молекул РНК, часто сайт-специфическим и точным путем, тем самым увеличивая репертуар кодированных геномом РНК на несколько порядков. Редактирующие РНК ферменты были описаны для эукариотических видов во всем животном и растительном царствах, и эти процессы играют важную роль в управлении клеточным гомеостазом у многоклеточных организмов от самых простых форм жизни (таких как *Caenorhabditis elegans*) до людей. Примерами редактирования РНК являются превращения аденозина (А) в инозин (I) и цитидина (С) в уридин (U), которые происходят посредством ферментов, называемых аденозиндезаминазой и цитидиндезаминазой соответственно. Наиболее широко изученная система редактирования РНК представляет собой фермент аденозиндезаминазу.

Аденозиндезаминаза представляет собой многодоменный белок, содержащий в зависимости от рассматриваемого фермента от 2 до 3 доменов распознавания двухцепочечных РНК и каталитического домена. Домен распознавания распознает специфическую последовательность двухцепочечной РНК (dsRNA) и/или конформацию, тогда как каталитический домен превращает аденозин (А) в инозин (I) в соседнем, более или менее predetermined, положении в целевой РНК путем дезаминирования нуклеотидного основания. Инозин считывается как гуанин трансляционным механизмом клетки, а это означает, что если отредактированный аденозин находится в кодирующей области мРНК или пре-мРНК, он может перекодировать белковую последовательность.

Превращения А в I могут также встречаться в 5'-некодирующих последовательностях целевой мРНК, создавая новые исходные сайты трансляции выше против хода транскрипции от исходного сайта, что приводит к появлению удлиненных на N-конце белков, или в 3' UTR или других некодирующих частях транскрипта, которые могут влиять на процессинг и/или стабильность РНК. Кроме того, превращение А в I могут происходить в элементах сплайсинга в интронах или экзонах в пре-мРНК, тем самым изменяя паттерн сплайсинга. Вследствие этого экзоны могут быть включены или пропущены. Аденозиндезаминазы представляют собой часть семейства ферментов, называемых действующими на РНК аденозиндезаминазами (ADAR), включая в себя человеческие дезаминазы hADAR1, hADAR2 и hADAR3.

Было описано использование олигонуклеотидов для редактирования целевой РНК с применением аденозиндезаминазы (например, Monti et al., *PNAS*, 2013, 110(45):18285-18290; Vogel et al., 2014, *Angewandte Chemie Int Ed*, 53:267-271; Woolf et al., 1995., *PNAS*, 92:8298-8302). Montiel-Gonzalez et al. (2013) описал редактирование целевой РНК с использованием генетически сконструированного слитого белка, содержащего домен аденозиндезаминазы белка hADAR2, слитый с белком N бактериофага лямбда, который распознает последовательность шпильки РНК boxB. Природные связывающие dsRNA домены в hADAR2 были удалены, чтобы исключить свойства распознавания субстрата природной ADAR, и заменены доменом распознавания boxB белка N лямбда. Авторы создали антисмысловый олигонуклеотид, содержащий часть "гидовой РНК", которая комплементарна целевой последовательности для редактирования, слитую с частью boxB для специфического распознавания последовательности слитым белком N-домен-дезаминаза. Таким образом, было изящно показано, что олигонуклеотид гидовой РНК точно направляет слитый белок аденозиндезаминазы на целевой сайт, что приводит к направленному гидовой РНК специфическому редактированию А на I целевой РНК. Эти гидовые РНК, описанные в публикации Montiel-Gonzalez et al. (2013), длиннее чем 50 нуклеотидов, которые, как правило, слишком велики для терапевтических применений (трудности при изготовлении и входе в клетки). Недостаток этого способа в терапевтическом плане также представляет собой потребность в слитом белке, состоящем из домена распознавания boxB белка N бактериофага лямбда, генетически слитого с доменом аденозиндезаминазы усеченного природного белка ADAR. Это требует, чтобы целевые клетки подвергались трансдукции со слитым белком, который представляет собой основное препятствие, или чтобы целевые клетки трансфицировали с конструкцией нуклеиновой кислоты, кодирующей сконструированный слитый белок аденозиндезаминазы для экспрессии. Последнее требование не представляет собой второстепенное препятствие, когда редактирование должно быть достигнуто в многоклеточном организме, например, при лечении заболеваний человека для коррекции генетического нарушения.

Vogel et al. (2014) раскрыл редактирование РНК-кодирования для eCFP и фактора V Лейдена с использованием замещенной бензилгуанином гидовой РНК и генетически сконструированного слитого белка, содержащего домены аденозиндезаминазы ADAR1 или 2 (без доменов связывания dsRNA), генетически слитых с доменом SNAP-tag (сконструированная O<sub>6</sub>-алкилгуанин-ДНК-алкилтрансфераза). Несмотря на то, что генетически сконструированный слитый белок искусственной дезаминазы может быть нацелен на желаемый сайт редактирования в целевых РНК в клетках HeLa в культуре через его домен SNAP-tag, который ковалентно связан с гидовой РНК через 5'-концевую модификацию O<sub>6</sub>-бензилгуанина,

эта система страдает от подобных недостатков из-за генетически сконструированных ADAR, описанных Montiel-Gonzalez et al. (2013), в том, что неясно, как применять систему без первоначального генетического изменения ADAR, а затем трансфицировать или трансдуцировать клетки, несущие целевую РНК, для обеспечения клеток этим генетически сконструированным белком. Очевидно, что эта система не легко адаптируется для использования у людей, например, в терапевтическом плане.

Woolf et al. (1995) раскрыл более простой подход с использованием относительно длинных одноцепочечных антисмысловых олигонуклеотидов РНК (длиной 25-52 нуклеотида), причем более длинные олигонуклеотиды (34-мер и 52-мер) могут способствовать редактированию целевой РНК посредством эндогенной ADAR из-за двухцепочечной природы целевой РНК и олигонуклеотида, гибридирующегося с ней. Олигонуклеотиды Woolf et al. (1995), которые были на 100% комплементарны только целевым последовательностям РНК, по всей видимости, функционировали в клеточных экстрактах или в ооцитах земноводных (*Xenopus*) посредством микроинъекции и страдали от серьезной нехватки специфичности: редактировали почти все аденозины в цепи целевой РНК, которые были комплементарны антисмысловому олигонуклеотиду. Исследовали олигонуклеотид длиной 34 нуклеотида, в котором каждый нуклеотид содержал 2'-О-метил-модификацию, и показали, что он неактивен в публикации Woolf et al. (1995). Для обеспечения устойчивости к нуклеазам также испытали 34-мерную РНК, модифицированную 2'-О-метил-модифицированными фосфоротиоатными нуклеотидами на 5'- и 3'-концевых 5 нуклеотидах. Было показано, что центральная немодифицированная область этого олигонуклеотида может способствовать редактированию целевой РНК посредством эндогенной ADAR, с использованием терминальных модификаций, обеспечивающих защиту от деградации экзонуклеазой. Woolf et al. (1995) не достигает дезаминирования специфического целевого аденозина в целевой последовательности РНК. Как уже упоминалось, почти все аденозины, противоположные немодифицированному нуклеотиду в антисмысловом олигонуклеотиде, были отредактированы (следовательно почти все аденозины противоположных нуклеотидов в центральной немодифицированной области, если 5'- и 3'-концевые 5 нуклеотидов антисмыслового олигонуклеотида были модифицированы, или почти все аденозины в целевой цепи РНК, если нуклеотиды не были модифицированы). Известно, что ADAR может действовать на любую dsRNA. Через процесс, иногда называемый "неизбирательное редактирование", фермент будет редактировать несколько А в dsRNA. Следовательно, существует потребность в способах и средствах, которые обходят такое неизбирательное редактирование и которые нацеленно воздействуют только на конкретные аденозины в целевой последовательности РНК для применимости в терапевтических целях. Vogel et al. (2014) показал, что такое редактирование вне мишени может быть подавлено с использованием 2'-О-метил-модифицированных нуклеотидов в олигонуклеотиде в положениях, противоположных аденозинам, которые не следует редактировать, и использовать немодифицированный нуклеотид, непосредственно противоположный специфически нацеленному аденозину на целевую РНК. Однако эффект специфического редактирования в целевом нуклеотиде не показан в этой статье без использования рекомбинантных ферментов ADAR, которые содержат ковалентные связи с антисмысловым олигонуклеотидом.

Отмечается, что существует еще один способ редактирования, который использует олигонуклеотиды, известные как система CRISPR/Cas9. Однако этот комплекс редактирования действует на ДНК. Он также страдает от того же недостатка, что и разработанные выше ADAR-системы, поскольку он требует совместной доставки в целевую клетку фермента CRISPR/Cas9 или конструкции экспрессии, кодирующей ее, вместе с гидовым олигонуклеотидом.

Ввиду вышеизложенного остается необходимость в новых способах и соединениях, которые могут использовать эндогенные клеточные пути и доступные в природе ферменты ADAR для специфического редактирования эндогенных нуклеиновых кислот в клетках млекопитающих даже в целых организмах без проблем, связанных со способами предшествующего уровня техники.

#### **Краткое раскрытие настоящего изобретения**

Настоящее изобретение устраняет недостатки способов в соответствии с предшествующим уровнем техники путем обеспечения целевого подхода к редактированию РНК с использованием согласно одному варианту осуществления антисмыслового олигонуклеотида (AON), способного образовывать двухцепочечный комплекс с целевой РНК в клетке, для дезаминирования специфического целевого аденозина в указанной целевой РНК ферментом ADAR млекопитающего, присутствующим в указанной клетке; причем указанный AON комплементарен целевой РНК, содержащей целевой аденозин, причем указанный AON необязательно содержит одно или более несоответствий, неоднозначных соответствий и/или выпуклостей с указанной целевой РНК; причем AON содержит один или более нуклеотидов с модификацией сахара, при условии, что нуклеотид, противоположный целевому аденозину, содержит рибозу с 2'-ОН-группой или дезоксирибозу с 2'-Н-группой; причем AON не содержит (некомплементарную) часть (не комплементарную мишени и не комплементарную по отношению к себе), которая способна образовывать внутримолекулярную структуру петля-на-стебле, которая способна связывать фермент ADAR млекопитающих; причем AON не содержит 5'-концевой O<sub>6</sub>-бензилгуанин или 5'-концевую аминоксимомодификацию; и причем AON не связан ковалентно с доменом SNAP-tag. AON по настоящему изобретению предпочтительно находится в своей основной структуре одноцепочечного редактирующего РНК олигонуклеотида. Согласно предпочтительному варианту осуществления нуклеотид, противоположный

целевому аденозину, представляет собой цитидин или уридин, более предпочтительно цитидин. Согласно еще одному предпочтительному аспекту нуклеотид непосредственно 5' и/или 3' от нуклеотида, противоположного целевому аденозину, содержит рибозу с 2'-ОН-группой или дезоксирибозу с 2'-Н-группой. Чтобы предотвратить деградацию эндонуклеазами в максимально возможной степени, предпочтительно, чтобы все остальные нуклеотиды в указанном АОН, кроме нуклеотида, который находится напротив целевого аденозина, и одного или обоих нуклеотидов, непосредственно смежных с находящимся напротив нуклеотидом, содержали бы 2'-О-алкильную группу, предпочтительно 2'-О-метильную группу. Согласно другому предпочтительному аспекту каждый нуклеотид, противоположный аденозину в целевой последовательности РНК, содержит 2'-О-алкильную группу, предпочтительно 2'-О-метильную группу, за исключением нуклеотида, противоположного целевому аденозину, который содержит рибозу с 2'-ОН-группой. Согласно еще одному предпочтительному варианту осуществления АОН содержит помимо цитидина, противоположного целевому аденозину (который может иметь одно несоответствие), по меньшей мере одну дополнительную пару оснований с несоответствием или неоднозначным соответствием с целевой последовательностью. Наличие по меньшей мере одной дополнительной пары оснований с несоответствием или неоднозначным соответствием может усилить эффективность редактирования РНК, возможно, потому что усиливает измененную скорость ассоциации/диссоциации АОН с его целевой молекулой и/или связывание молекулы ADAR с dsRNA и/или распознавание ею, также в зависимости от целевой последовательности. Как указано в настоящем документе, одно конкретное предпочтительное положение для дополнительного несоответствия и/или неоднозначной пары оснований между АОН и целевой последовательностью (помимо предпочтительного С-А целевого положения) представляет собой положение на четыре нуклеотида выше против хода транскрипции (в направлении 5') от целевого аденозина в целевой последовательности. Также в настоящем документе раскрыто, что в зависимости от целевой последовательности дополнительные несоответствия и/или неоднозначные пары оснований, а также дополнительные выступы (не спаривающиеся нуклеотиды и небольшие удлинения из петли) могут усилить эффективность редактирования РНК. Поэтому предпочтительный аспект настоящего изобретения представляет собой наличие дополнительных выпуклостей, несоответствий и/или неоднозначных соответствий между АОН и целевой последовательностью, кроме разницы между цитидином, противоположным целевому аденозину (или кроме уридина, напротив целевого аденозина, который представляет собой не несоответствие, но который может быть предпочтительным для определенных целевых последовательностей). Согласно предпочтительному аспекту клетка, в которую вводится АОН, представляет собой клетку человека. Согласно еще одному предпочтительному аспекту АОН по настоящему изобретению содержит по меньшей мере одну фосфоротиоатную связь, предпочтительно, когда 2, 3, 4, 5 или 6 концевых нуклеотидов 5'- и 3'-конца АОН связаны с фосфоротиоатными связями, еще более предпочтительно, когда терминальные пять нуклеотидов на 5'- и 3'-конце связаны с (в этом случае четырьмя) фосфоротиоатными связями. Согласно одному варианту осуществления АОН по настоящему изобретению не содержит 5'-кэп. Согласно другому варианту осуществления настоящего изобретения АОН не является 17-мерным или 20-мерным. Согласно другому варианту осуществления настоящего изобретения часть АОН, которая комплементарна целевой последовательности РНК, длиннее 17 нуклеотидов или короче 14 нуклеотидов. Настоящее изобретение также относится к фармацевтической композиции, содержащей АОН в соответствии с настоящим изобретением и фармацевтически приемлемый носитель.

Настоящее изобретение также относится к АОН в соответствии с настоящим изобретением для применения при лечении или предотвращении генетического нарушения, предпочтительно выбранного из группы, состоящей из муковисцидоза, синдрома Гурлера, дефицита альфа-1-антитрипсина (A1AT), болезни Паркинсона, болезни Альцгеймера, альбинизма, бокового амиотрофического склероза, астмы,  $\beta$ -талассемии, синдрома Кадасила, болезни Шарко-Мари-Тута, хронической обструктивной болезни легких (COPD), дистальной спинальной мышечной атрофии (DSMA), мышечной дистрофии Дюшенна/Беккера, дистрофического буллезного эпидермоза, буллезного эпидермоза, болезни Фабри, связанных с фактором V Лейдена нарушений, семейного аденоматозного полипоза, галактоземии, болезни Гоше, дефицита глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, гемофилии, наследственного гемохроматоза, синдрома Хантера, болезни Хантингтона, воспалительного заболевания кишечника (IBD), наследственного синдрома полиагглютинации, врожденного амароза Лебера, синдрома Леша-Нихана, синдрома Линча, синдрома Марфана, мукополисахаридоза, мышечной дистрофии, миотонической дистрофии I и II типов, нейрофиброматоза, болезни Ниманна-Пика типа А, В и С, связанного с NY-esol рака, синдрома Пейтца-Егерса, фенилкетонурии, болезни Помпе, первичного цилиарного заболевания, нарушений, связанных с протромбиновой мутацией, такой как мутация G20210A протромбина, легочной гипертензии, пигментной дистрофии сетчатки, болезни Сандхоффа, синдрома тяжелой комбинированной иммунной недостаточности (SCID), серповидно-клеточной анемии, спинальной мышечной атрофии, болезни Старгардта, болезни Тай-Сакса, синдрома Ушера, связанного с X-хромосомой иммунодефицита и рака.

Настоящее изобретение также относится к способу дезаминирования специфического целевого аденозина, присутствующего в целевой последовательности РНК в клетке, причем указанный способ предусматривает следующие стадии: предоставление указанной клетки с АОН согласно настоящему изобретению; обеспечение возможности захватывать клеткой указанного АОН; обеспечение возможности отжига

указанного AON с целевой последовательностью РНК; обеспечение возможности ферменту ADAR млекопитающего, содержащему природный связывающий dsRNA домен, который обнаружен в ферменте дикого типа, дезаминировать указанный целевой аденозин в указанной целевой последовательности РНК до инозина; и идентификация присутствия указанного инозина в последовательности РНК.

Согласно предпочтительным вариантам осуществления настоящего изобретения целевая последовательность РНК кодирует CFTR (например, для редактирования мутации 1784G>A), CEP290 (например, для редактирования мутации с.2991+1655A>G), альфа1-антитрипсин (A1AT, например, для редактирования мутации 9989G>A или мутации 1096G>A), LRRK2 (например, для редактирования мутации G6055), BDNF (например, для восстановления мутации Val66Met на уровне РНК) или при этом целевая РНК кодируется геном IDUA (например, для редактирования мутации с.1205G>A (W402X)).

#### Краткое описание графических материалов

На фиг. 1 показана комплементарность антисмысловых олигонуклеотидов (верхние нити) к GFP-стоп целевой последовательности (нижние нити). В панелях A-D часть последовательности целевой РНК показана от 5' к 3' (нижняя нить на каждой панели), а целевой аденозин (A) выделен жирным шрифтом. Последовательность олигонуклеотидов в верхней нити показана от 3' к 5', при этом подчеркиваются несоответствия, неоднозначные соответствия и "выпуклости". Химические модификации не показаны. Нижняя нить на всех панелях одинакова (SEQ ID NO: 5) и отражает только часть целевой последовательности GFP. UAG в целевой последовательности представляет собой стоп-кодон (от 5' к 3'), который, когда A отредактирован до I (считывается как G), преобразуется в UGG, представляющий кодон Trp, позволяющий белку GFP быть полностью транслированным в функциональный белок. (A) Верхняя нить AON ADAR56 (SEQ ID NO: 1); (B) верхняя нить AON ADAR57 (SEQ ID NO: 2); (C) верхняя нить AON ADAR58 (SEQ ID NO: 3); (D) верхняя нить AON ADAR59 (SEQ ID NO: 4).

На фиг. 2 показана эффективность редактирования, анализируемая способом анализа последовательности. Хроматограммы (от A до J) показывают частоту нуклеотидов в целевом сайте (выделенном над центром A) и соседними нуклеотидами. Нуклеотидная идентичность пиков указана тем же цветом, что и в последовательности ниже хроматограмм, где G представлены в черном цвете. На панели (A) показаны результаты необработанных клеток (NT), а на панели (B) использовался только реагент трансфекции (CTRL). AON ADAR56 - ADAR59 использовали в концентрациях 50 или 100 нМ, как показано на панелях (C-J). Существует явное увеличение сигнала G над центральным A (показано как "плечо" в соседнем G-сигнале, в то время как в контролях плечо не наблюдается), что показывает, что во всех четырех случаях с использованием любого из четырех AON редактирование РНК произошло в этом положении.

На фиг. 3 показаны результаты секвенирования после использования ADAR59-2 и ADAR72-1 (которые по сравнению с ADAR59-2 содержат дополнительные неоднозначные пары оснований) в лизате клеток HeLa из клеток, трансфицированных ADAR2a в целевой последовательности GFP. Дополнительные неоднозначные соответствия добавляют к эффективности редактирования РНК. Положение отредактированной мишени указано стрелкой.

На фиг. 4 показана ферментативная активность (как относительная единица флуоресценции, нормированная к общей концентрации белка), измеренная в анализе  $\alpha$ -L-идуронидазы. Как указано, средняя активность и стандартное отклонение от двух повторяющихся измерений показаны для каждого AON. NT: не обработанные.

На фиг. 5A и 5B показан тот же ферментативный анализ, что и на фиг. 4, после использования двух пар антисмысловых олигонуклеотидов, которые отличаются друг от друга несоответствием с целевой последовательностью в положении 4 выше против хода транскрипции целевой последовательности, что указывает на положительный эффект этой конкретной дополнительной выпуклости между олигонуклеотидом и целевой последовательностью.

Фиг. 6 представляет собой вестерн-блот восьми различных линий рака человека (нумерация полос в соответствии с таблицей в нижней панели), оценивающий экспрессию ADAR1 и ADAR2 для последующего анализа эндогенной активности ADAR.

На фиг. 7 показаны результаты секвенирования продукта ПЦР, полученного из целевой плазмиды GFPstop57, которую инкубировали с четырьмя различными антисмысловыми олигонуклеотидами (ADAR56-2, ADAR57-2, ADAR58-2 и ADAR59-2, сокращены в настоящем документе до 56-2, 57-2, 58-2 и 59-2 соответственно) в клетках рака печени SNU-475. ADAR59-2=ADAR59. РНК-редактирование происходило без необходимости сверхэкспрессии ферментов ADAR. "Fwd"=прямое секвенирование; "Rev"=обратное секвенирование. Место целевого аденозина (смещение к гуанозину в прямой последовательности и цитидину в обратной последовательности) указано стрелкой.

На фиг. 8 показаны результаты секвенирования продукта ПЦР, полученного из целевой плазмиды GFPstop57, которую инкубировали с четырьмя различными антисмысловыми олигонуклеотидами (ADAR56-2, ADAR57-2, ADAR58-2 и ADAR59-2, сокращены в настоящем документе до 56-2, 57-2, 58-2 и 59-2 соответственно) в клетках рака молочной железы MCF7. РНК-редактирование происходило без необходимости сверхэкспрессии ферментов ADAR. "Fwd"=прямое секвенирование. Место целевого аденозина (смещение к гуанозину) указано стрелкой. Никаких значительных смещений не наблюдалось с ADAR56-2, ADAR57-2 и ADAR58-2, но с ADAR59-2 наблюдался очень значительное смещение редакти-

рования РНК.

На фиг. 9 показаны данные последовательности области, окружающей целевой аденозин (стрелка) после воздействия ADAR57-2 (см. также фиг. 7, внизу слева) и показано, что дезаминирование не происходит у других аденозинов вблизи целевого аденозина и в целевой области AON.

На фиг. 10 (А) показана карта экспрессирующей плазмиды, несущей вставку GFPstop57. Последовательность нуклеиновой кислоты и полученная в результате аминокислотная последовательность GFP представлена в (В) и она показывает, что конструкция кодирует белок из 57 аминокислот из-за стоп-кодона TAG в триплете 58. Аденозин в этом кодоне TAG редактируют до инозина (считывается как гуанозин), приводя к кодону TGG, как описано в настоящем документе.

На фиг. 11 (А) показана 5'-концевая часть последовательности РНК гена полипептида А малых ядерных рибонуклеопротеинов (SNRPA) (SEQ ID NO: 16). В верхней нити кодирующая последовательность подчеркивается до стоп-кодона UAG (жирный шрифт). РНК-редактирование А в стоп-кодоне до I (учитывается как G) приводит к кодированию UGG для триптофана (W); отредактированная последовательность также представляется (SEQ ID NO: 17). Таким образом, это сквозное прочтение теоретически приводит к белку, который на 25 аминокислот длиннее, когда транслируется до последующего стоп-кодона (также выделен жирным шрифтом). На (В) показана та же 5'-концевая часть SNRPA, как указано в (А). Ниже последовательности кодирования приводятся последовательности AON ADAR87-1, ADAR89-1, ADAR89-2 и ADAR94-1. Выпуклости, неоднозначные соответствия и несоответствия подчеркнуты. Цитидин, противоположный целевому аденозину, представлен более крупным шрифтом. Три нуклеозида в центральном триплете 5'-CCA-3' в ADAR89-2 и ADAR94-1 представляют собой ДНК, тогда как все остальные нуклеозиды в этих олигонуклеотидах представляют собой РНК.

На фиг. 12 показаны результаты редактирования РНК на эндогенной РНК SNRPA в клетках мыши Нера 1-6 с использованием AON. На панели (А) показан контроль без трансфекции (NT). На панели (В) показан контроль, в котором трансфицирована только плаزمида, кодирующая короткую изоформу ADAR2. На панели (С) показано увеличение пика G, обозначенного стрелкой, которая указывает, что редактирование РНК (А на I) происходило в желаемом положении после трансфекции с помощью AON ADAR89-1 в клетках, которые не были трансфицированы с помощью сверхэкспрессирующей ADAR2 плазмиды. На панели (D) показан положительный контроль как с плазмидой экспрессии ADARsh, так и с AON.

На фиг. 13 показаны результаты секвенирования после введения AON ADAR89-2 и ADAR94-1 в клетки мыши Нера 1-6, и показано, что редактирование РНК может быть достигнуто с помощью AON, которые содержат нуклеозиды ДНК в центральном триплете напротив целевого аденозина, и что такое редактирование РНК может быть дополнительно увеличено при введении дополнительных несоответствий.

#### **Подробное описание настоящего изобретения**

В публикации международной заявки WO 2016/097212 раскрыты антисмысловые олигонуклеотиды (AON) для целевого редактирования РНК, причем AON характеризуются последовательностью, комплементарной целевой последовательности РНК (в настоящем документе упоминается как "нацеливающий участок"), и наличием структуры петля-на-стебле (в настоящем документе упоминается как "мобилизующий участок"), которая предпочтительно некомплементарна целевой РНК. Такие олигонуклеотиды называются "AON с самоформирующейся петлей". Мобилизующий участок действует при мобилизации природного фермента ADAR, присутствующего в клетке, в dsRNA, образованную гибридизацией целевой последовательности с нацеливающим участком. Благодаря мобилизирующему участку нет необходимости в конъюгированных элементах или наличии модифицированных рекомбинантных ферментов ADAR. В публикации международной заявки WO 2016/097212 описана часть мобилизации как структура петля-на-стебле, имитирующая либо природный субстрат (например, GluB-рецептор), либо структуру Z-ДНК, которая, как известно, распознается связывающими dsRNA областями ферментов ADAR. Структура петля-на-стебле может представлять собой межмолекулярную структуру петля-на-стебле, образованную двумя отдельными нитями нуклеиновой кислоты, или внутримолекулярную структуру петля-на-стебле, образованную в одной цепи нуклеиновой кислоты. Структура петля-на-стебле мобилизующего участка, как описано в публикации международной заявки WO 2016/097212, представляет собой внутримолекулярную структуру петля-на-стебле, образованную внутри самой AON и способную привлекать ADAR.

AON согласно настоящему изобретению не содержат мобилизующий участок, как описано в публикации международной заявки WO 2016/097212. AON согласно настоящему изобретению не содержат участок, который способен образовывать внутримолекулярную структуру петля-на-стебле. AON согласно настоящему изобретению короче, что делает их более дешевыми для производства, проще в использовании и проще в изготовлении. Кроме того, у них нет недостатка потенциально связывающих ферментов ADAR в отношении их нормальной функции в клетке. Неожиданно изобретатели настоящего изобретения обнаружили, что AON, которые комплементарны целевой РНК для дезаминирования целевого аденозина, присутствующего в целевой последовательности РНК, к которой комплементарен AON, но, что важно, не имеют описанного выше мобилизующего участка, способны использовать ферменты ADAR, присутствующие в клетке, для редактирования целевого аденозина. Согласно предпочтительному аспекту AON согласно настоящему изобретению содержит несоответствие в положении целевого аденозина, причем противоположный нуклеотид в AON представляет собой цитидин. Также, когда уридин

находится напротив целевого аденозина (который фактически не был бы несоответствием), AON способен приводить к дезаминированию целевого аденозина. Авторы настоящего изобретения обнаружили, что дополнительные несоответствия, неоднозначные соответствия и/или выпуклости из петли (вызванные нуклеотидами в антисмысловом олигонуклеотиде, которые не образуют идеальных пар оснований с целевой РНК в соответствии с правилами спаривания оснований Уотсона-Крика) являются допустимыми, в некоторых случаях предпочтительными, но в возрастающих количествах не всегда необходимы для конкретного специфического нацеленного редактирования целевой последовательности РНК. Количество несоответствий, неоднозначных соответствий или выпуклостей в AON согласно настоящему изобретению (когда он гибридизуется со своей целевой последовательностью РНК) может быть равно нулю (когда нуклеозид, противоположный целевому аденозину, представляет собой уридин, а остальная часть AON также на 100% комплементарна целевой последовательности), может быть одним (которое может представлять собой одно несоответствие, образованное в положении целевого аденозина, когда цитозин является противоположным нуклеозидом, или в каком-либо другом положении в AON) или более (либо включая в себя, либо не включая в себя) несоответствия целевому аденозину) в зависимости от длины AON. Дополнительные несоответствия, неоднозначные соответствия или выпуклости могут находиться против хода транскрипции, а также ниже по ходу транскрипции от целевого аденозина. Согласно конкретному предпочтительному варианту осуществления несоответствие или неоднозначное соответствие присутствует в положении в четырех нуклеотидах выше против хода транскрипции (к 5'-концу) от целевого аденозина, который также может представлять собой единственное несоответствие или неоднозначное соответствие, когда уридин образует пару с целевым аденозином, или который может затем представлять собой дополнительное несоответствие или неоднозначное соответствие, когда нуклеозид, противоположный целевому аденозину, представляет собой цитидин. Выпуклости или несоответствия могут находиться в одном положении (вызванном одной несоответствующей, неоднозначной или выпуклой парой оснований) или рядом нуклеотидов, которые не являются полностью комплементарными (вызваны более чем одной последовательной несоответствующей или неоднозначной парой оснований или выпуклостью, предпочтительно двумя или тремя последовательными несоответствующими и/или неоднозначными парами оснований и/или выпуклостями).

В любом случае AON согласно настоящему изобретению обладают определенными преимуществами по сравнению с олигонуклеотидами, описанными в публикации международной заявки WO 2016/097212, поскольку нет необходимости в структурах шпильки или петля-на-стебле, которые позволяют использовать более короткие (значительно) AON по настоящему изобретению. Более того, олигонуклеотиды, описанные в публикации международной заявки WO 2016/097212, имеют потенциальный риск секвестрации ферментом ADAR, присутствующим в клетке. Под секвестрацией в этом контексте подразумевается, что природный белок ADAR может связываться с олигонуклеотидами, описанными в публикации международной заявки WO 2016/097212, даже в отсутствие образования комплекса dsRNA между целевой частью олигонуклеотида и целевой РНК. Это прямое связывание ADAR с олигонуклеотидами, описанными в публикации международной заявки WO 2016/097212 (из-за наличия внутримолекулярной структуры петля-на-стебле), в отсутствие целевых последовательностей РНК не происходит при использовании AON по настоящему изобретению, которые не содержат участок, который способен образовывать внутримолекулярную структуру петля-на-стебле. Хотя олигонуклеотиды, описанные в публикации международной заявки WO 2016/097212, могут характеризоваться определенными применениями, существует множество случаев, когда предпочтительно избегать наличия шпилек и/или структур петля (на стебле).

Таким образом, настоящее изобретение относится к антисмысловому олигонуклеотиду (AON), способному образовывать двухцепочечный комплекс с целевой РНК в клетке, для дезаминирования целевого аденозина, присутствующего в целевой РНК, с помощью фермента ADAR, присутствующего в клетке, причем AON комплементарен целевой РНК-области, содержащей целевой аденозин, и AON необязательно содержит одно или более несоответствий, неоднозначных соответствий и/или выпуклостей с комплементарной областью целевой РНК; AON содержит один или более нуклеотидов с одной или более модификациями сахара, при условии, что нуклеотид, противоположный целевому аденозину, содержит рибозу с 2'-ОН-группой или дезоксирибозу с 2'-Н-группой; AON не содержит участок, который способен образовывать внутримолекулярную структуру петля-на-стебле, которая способна связывать фермент ADAR; AON не содержит 5'-концевую модификацию O<sub>6</sub>-бензилгуанина; AON не содержит 5'-концевую аминоксидную модификацию и AON не связан ковалентно с доменом SNAP-tag.

Согласно предпочтительному аспекту нуклеотид в AON, противоположный целевому аденозину, представляет собой не РНК, а ДНК, и согласно еще более предпочтительному аспекту нуклеотид, противоположный целевому аденозину, а также нуклеотид 5' и/или 3' от нуклеотида, противоположного целевому аденозину, представляют собой нуклеотиды ДНК, в то время как остальная часть (не ДНК) нуклеотидов в AON предпочтительно представляют собой 2'-О-алкил-модифицированные рибонуклеотиды. Когда два нуклеотида представляют собой ДНК, все остальные могут представлять собой РНК и могут быть 2'-О-метил-модифицированными, тогда как согласно определенным аспектам третий нуклеотид в триplete, противоположном целевому аденозину, может представлять собой РНК и быть немодифицированным, если нуклеотид, противоположный целевому аденозину не является 2'-О-метил-

модифицированным. Согласно одному конкретному аспекту настоящее изобретение относится к AON, способному образовывать двухцепочечный комплекс с целевой РНК в клетке для дезаминирования целевого аденозина, присутствующего в целевой РНК, с помощью фермента, присутствующего в клетке (вероятно, фермента ADAR), причем AON (частично) комплементарен целевой области РНК, содержащей целевой аденозин, причем нуклеотид, противоположный целевому аденозину, содержит дезоксирибозу с 2'-Н-группой, причем нуклеотид 5' и/или 3' от нуклеотида напротив целевого аденозина также содержит дезоксирибозу с 2'-Н-группой, а остальная часть AON содержит рибонуклеозиды, предпочтительно все с 2'-О-метил-модификациями.

Согласно другому аспекту настоящее изобретение относится к AON, способному образовывать двухцепочечный комплекс с целевой РНК в клетке для дезаминирования целевого аденозина, присутствующего в целевой РНК, с помощью фермента ADAR, присутствующего в клетке, причем AON комплементарен целевой области РНК, содержащей целевой аденозин, и AON необязательно содержит одно или более несоответствий, неоднозначных соответствий и/или выпуклостей с комплементарной областью целевой РНК; AON содержит один или более нуклеотидов с одной или более модификациями сахара, при условии, что нуклеотид, противоположный целевому аденозину, содержит рибозу с 2'-ОН-группой или дезоксирибозу с 2'-Н-группой; AON не содержит участок, который способен образовывать внутримолекулярную структуру петля-на-стебле, которая способна связывать фермент ADAR; и AON не является 17- или 20-мерным.

Согласно другому аспекту настоящее изобретение относится к AON, способному образовывать двухцепочечный комплекс с целевой РНК в клетке для дезаминирования целевого аденозина, присутствующего в целевой РНК, с помощью фермента ADAR, присутствующего в клетке, причем AON комплементарен целевой области РНК, содержащей целевой аденозин, и AON необязательно содержит одно или более несоответствий, неоднозначных соответствий и/или выпуклости с комплементарной областью целевой РНК; AON содержит один или более нуклеотидов с одной или более модификациями сахара, при условии, что нуклеотид, противоположный целевому аденозину, содержит рибозу с 2'-ОН-группой или дезоксирибозу с 2'-Н-группой; AON не содержит участок, который способен образовывать внутримолекулярную структуру петля-на-стебле, которая способна связывать фермент ADAR; и AON длиннее 17 нуклеотидов или короче 14 нуклеотидов.

Согласно еще одному аспекту настоящее изобретение относится к AON, способному образовывать двухцепочечный комплекс с целевой РНК в клетке для дезаминирования целевого аденозина, присутствующего в целевой РНК, с помощью фермента ADAR, присутствующего в клетке, причем AON комплементарен целевой области РНК, содержащей целевой аденозин; AON содержит один или более нуклеотидов с одной или более модификациями сахара, при условии, что нуклеотид, противоположный целевому аденозину, содержит рибозу с 2'-ОН-группой или дезоксирибозу с 2'-Н-группой; AON не содержит участок, который способен образовывать внутримолекулярную структуру петля-на-стебле, которая способна связывать фермент ADAR; AON необязательно содержит 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 несоответствий, неоднозначных соответствий и/или выпуклостей с комплементарной областью целевой РНК. Предпочтительно, нуклеотид, противоположный целевому аденозину, представляет собой цитидин, дезоксицитидин, уридин или дезоксиуридин. Когда нуклеотид, противоположный целевому аденозину, представляет собой цитидин или дезоксицитидин, AON содержит по меньшей мере одно несоответствие с целевой РНК. Когда нуклеотид, противоположный целевому аденозину, представляет собой уридин или дезоксиуридин, AON может быть 100% комплементарным и не иметь никаких несоответствий, неоднозначных соответствий или выпуклостей по отношению к целевой РНК. Однако согласно предпочтительному аспекту между AON и целевой РНК присутствует одно или более дополнительных несоответствий, независимо от того, является ли нуклеотид противоположным целевому аденозину, цитидином, дезоксицитидином, уридином или дезоксиуридином. Согласно другому предпочтительному варианту осуществления нуклеотид, расположенный непосредственно 5' и/или 3' от нуклеотида, противоположного целевому аденозину, содержит рибозу с 2'-ОН-группой или дезоксирибозу с 2'-Н-группой, или их смесь (триплет состоит тогда из ДНК-ДНК-ДНК, ДНК-ДНК-РНК, РНК-ДНК-ДНК, РНК-ДНК-РНК или РНК-РНК-РНК, предпочтительно при этом средний нуклеозид не содержит 2'-О-метил-модификацию (когда РНК) и один или оба окружающих нуклеозидов также не содержат 2'-О-метил-модификации). Затем предпочтительно, чтобы все остальные нуклеотиды в AON содержали 2'-О-алкильную группу, предпочтительно 2'-О-метильную группу, или 2'-О-метоксиэтильную группу (2'-МОЕ), или любую модификацию, как раскрыто в настоящем документе. AON согласно настоящему изобретению предпочтительно содержат по меньшей мере одну фосфоротиоатную связь. Согласно еще одному предпочтительному аспекту 2, 3, 4, 5 или 6 концевых нуклеотидов 5'- и 3'-конца AON связаны с фосфоротиоатными связями. Более предпочтительно, 5 концевых нуклеотидов на 5'- и 3'-конце связаны с фосфоротиоатными связями. Согласно одному конкретному варианту осуществления настоящего изобретения AON длиннее, чем 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 или 17 нуклеотидов. Предпочтительно AON короче, чем 100 нуклеотидов, более предпочтительно короче, чем 60 нуклеотидов, и еще более предпочтительно AON содержит от 18 до 70 нуклеотидов, от 18 до 60 нуклеотидов или от 18 до 50 нуклеотидов. Настоящее изобретение также относится к фармацевтической композиции, содержащей AON в соответствии с настоящим изобретением и фармацевтически приемлемый



носитель. Настоящее изобретение также относится к AON в соответствии с настоящим изобретением для применения при лечении или профилактике генетического нарушения, предпочтительно выбранного из группы, состоящей из муковисцидоза, синдрома Гурлера, дефицита альфа-1-антитрипсина (A1AT), болезни Паркинсона, болезни Альцгеймера, альбинизма, бокового амиотрофического склероза, астмы,  $\beta$ -талассемии, синдрома Кадасила, болезни Шарко-Мари-Тута, хронической обструктивной болезни легких (COPD), дистальной спинальной мышечной атрофии (DSMA), мышечной дистрофии Дюшенна/Беккера, дистрофического буллезного эпидермоза, буллезного эпидермоза, болезни Фабри, связанных с фактором V Лейдена нарушений, семейного аденоматозного полипоза, галактоземии, болезни Гоше, дефицита глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, гемофилии, наследственного гемохроматоза, синдрома Хантера, болезни Хантингтона, воспалительного заболевания кишечника (IBD), наследственного синдрома полиагглютинации, врожденного амароза Лебера, синдрома Леша-Нихана, синдрома Линча, синдрома Марфана, мукополисахаридоза, мышечной дистрофии, миотонической дистрофии I и II типов, нейрофиброматоза, болезни Ниманна-Пика типа A, B и C, связанного с NY-eso1 рака, синдрома Пейтца-Егерса, фенилкетонурии, болезни Помпе, первичного цилиарного заболевания, нарушений, связанных с протромбиновой мутацией, такой как мутация G20210A протромбина, легочной гипертензии, пигментной дистрофии сетчатки, болезни Сандхоффа, синдрома тяжелой комбинированной иммунной недостаточности (SCID), серповидно-клеточной анемии, спинальной мышечной атрофии, болезни Старгардта, болезни Тай-Сакса, синдрома Ушера, связанного с X-хромосомой иммунодефицита и рака. Согласно другому аспекту настоящее изобретение относится к применению AON в соответствии с настоящим изобретением при изготовлении лекарственного средства для лечения или профилактики генетического нарушения, предпочтительно выбранного из группы, состоящей из муковисцидоза, синдрома Гурлера, дефицита альфа-1-антитрипсина (A1AT), болезни Паркинсона, болезни Альцгеймера, альбинизма, бокового амиотрофического склероза, астмы,  $\beta$ -талассемии, синдрома Кадасила, болезни Шарко-Мари-Тута, хронической обструктивной болезни легких (COPD), дистальной спинальной мышечной атрофии (DSMA), мышечной дистрофии Дюшенна/Беккера, дистрофического буллезного эпидермоза, буллезного эпидермоза, болезни Фабри, связанных с фактором V Лейдена нарушений, семейного аденоматозного полипоза, галактоземии, болезни Гоше, дефицита глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, гемофилии, наследственного гемохроматоза, синдрома Хантера, болезни Хантингтона, воспалительного заболевания кишечника (IBD), наследственного синдрома полиагглютинации, врожденного амароза Лебера, синдрома Леша-Нихана, синдрома Линча, синдрома Марфана, мукополисахаридоза, мышечной дистрофии, миотонической дистрофии I и II типов, нейрофиброматоза, болезни Ниманна-Пика типа A, B и C, связанного с NY-eso1 рака, синдрома Пейтца-Егерса, фенилкетонурии, болезни Помпе, первичного цилиарного заболевания, нарушений, связанных с протромбиновой мутацией, такой как мутация G20210A протромбина, легочной гипертензии, пигментной дистрофии сетчатки, болезни Сандхоффа, синдрома тяжелой комбинированной иммунной недостаточности (SCID), серповидно-клеточной анемии, спинальной мышечной атрофии, болезни Старгардта, болезни Тай-Сакса, синдрома Ушера, связанного с X-хромосомой иммунодефицита и рака. Согласно еще одному варианту осуществления настоящее изобретение относится к способу дезаминирования по меньшей мере одного целевого аденозина, присутствующего в целевой РНК в клетке, причем способ предусматривает следующие стадии: предоставление клетки с AON в соответствии с настоящим изобретением; обеспечение возможности захватывать клеткой AON; что позволяет отжиг AON с целевой РНК; обеспечение возможности ферменту ADAR, содержащему природный связывающий dsRNA домен, обнаруженный в ферменте дикого типа, дезаминировать целевой аденозин в целевой РНК до инозина; и необязательно идентификация наличия инозина в целевой РНК, предпочтительно при этом последняя стадия предусматривает секвенирование целевой последовательности РНК; оценку наличия функционального, удлиненного, полноразмерного белка и/или белка дикого типа, когда целевой аденозин находится в стоп-кодоне UGA или UAG, который редактируется до кодона UGG посредством дезаминирования; оценку наличия функционального, удлиненного, полноразмерного белка и/или белка дикого типа, когда два целевых аденозина расположены в стоп-кодоне UAA, который редактируется до кодона UGG через дезаминирование обоих целевых аденозинов; оценку того, было ли сплайсирование пре-мРНК изменено дезаминированием; или использование функционального считывания, при котором целевая РНК после дезаминирования кодирует функциональный, полноразмерный, удлиненный белок и/или белок дикого типа. Согласно другому варианту осуществления настоящее изобретение относится к AON или способу в соответствии с настоящим изобретением, при котором целевая последовательность РНК кодирует CFTR (например, для редактирования мутации 1784G>A), CEP290 (например, для редактирования мутации с.2991+1655A>G), альфа-антитрипсин (A1AT, например, для редактирования мутации 9989G>A или мутации 1096G>A), LRRK2 (например, для редактирования мутации G6055), BDNF (например, для восстановления мутации Val66Met на уровне РНК) или при котором целевая РНК кодируется геном IDUA (например, для редактирования мутации с.1205G>A (W402X)).

Важным аспектом настоящего изобретения является то, что AON содержит один или более нуклеотидов с одной или более модификациями сахара. Таким образом, один нуклеотид AON может содержать одну или более чем одну модификацию сахара. В пределах AON один или более нуклеотидов могут со-

держат такую модификацию(и) сахара.

Также важным аспектом настоящего изобретения является то, что нуклеотид в AON по настоящему изобретению, который является противоположным нуклеотиду, который нуждается в редактировании, не содержит 2'-О-метил-модификацию (в настоящем документе часто упоминается как 2'-ОМе, или как 2'-О-метилование) и предпочтительно содержит 2'-ОН-группу или представляет собой дезоксирибозу с 2'-Н-группой. Предпочтительно, чтобы нуклеотиды, которые расположены непосредственно 3' и/или 5' от этого нуклеотида ("соседние нуклеотиды"), также не имели такой химической модификации, хотя считается, что допускается, что один из этих соседних нуклеотидов может содержать 2'-О-алкильную группу (такую как 2'-О-метильная группа), но предпочтительно не оба. Либо один, либо оба соседних нуклеотида могут представлять собой 2'-ОН или совместимую замену (как определено в настоящем документе).

Другим важным аспектом AON настоящего изобретения является то, что он не содержит участок, который комплементарен целевой РНК или области РНК, которая содержит целевой аденозин, который позволяет AON самому по себе складываться во внутримолекулярную шпильку или другой тип структуры петли (-на-стебле) (в настоящем документе также упоминается как "автовыпетливание" или "самовыпетливание") и которое потенциально может выступать в качестве структуры, которая связывает ADAR. Согласно одному аспекту одноцепочечный AON по настоящему изобретению полностью комплементарен целевой РНК, хотя он предпочтительно не идеально образует пару по меньшей мере в одном положении, которое находится в положении целевого аденозина, где противоположный нуклеозид тогда предпочтительно представляет собой цитидин. Одноцепочечные редактирующие РНК олигонуклеотиды по настоящему изобретению могут также иметь одно или более несоответствий, неоднозначных соответствий или выпуклостей (без противоположного нуклеозида) с целевой последовательностью в других положениях, чем в положении целевого аденозина. Эти неоднозначные соответствия, несоответствия и/или выпуклости AON по настоящему изобретению с целевой последовательностью не препятствуют гибридизации олигонуклеотида с целевой последовательностью РНК, но увеличивают эффективность редактирования РНК посредством ADAR, присутствующего в клетке, в положении целевого аденозина. Специалист в настоящей области техники способен определить, действительно ли происходит гибридизация в физиологических условиях. Предпочтительные одноцепочечные редактирующие РНК олигонуклеотиды по настоящему изобретению не содержат 5'-концевой O<sub>6</sub>-бензилгуанин или 5'-концевую аминоксидную модификацию и не ковалентно связаны с доменом SNAP-tag (сконструированная O<sub>6</sub>-алкилгуанин-ДНК-алкилтрансфераза), в отличие от Vogel et al. (2014). Домен SNAP-tag получают из O<sub>6</sub>-алкилгуанин-ДНК-алкилтрансферазы (AGT) ДНК ремонтного белка человека и он может быть ковалентно помечен в живых клетках с использованием производных O<sub>6</sub>-бензилгуанина. Публикация Vogel et al. (2014) раскрывает гидовые РНК с общей длиной 20 или 17 нуклеотидов, причем первые три нуклеотида на 5'-конце не связываются с целевой последовательностью РНК, но связывают гидовую РНК с доменом SNAP-tag. Таким образом, часть гидовой РНК, которая связывается с целевой последовательностью РНК, составляет в длину 14 или 17 нуклеотидов. Гидовые РНК одинаковой длины с 5'-концевой аминоксидной модификацией вместо 5'-концевой модификации O<sub>6</sub>-бензилгуанина также описаны в публикации Vogel et al. (2014), однако обнаруживалось только очень небольшое количество или отсутствие дезаминирования или целевой последовательности РНК. Согласно одному варианту осуществления AON по настоящему изобретению содержит менее четырех несоответствий и/или неоднозначных соответствий по отношению к целевой последовательности РНК. Аналогично предпочтительный AON по настоящему изобретению не содержит последовательность шпильки РНК boxB, в отличие от Montiel-Gonzalez et al (2013). Последовательность шпильки РНК boxB, используемая в Montiel-Gonzalez et al. (2013), представляет собой короткий участок РНК из 17 нуклеотидов (с последовательностью GGCCCUGAAAAAGGGCC, SEQ ID NO: 6), которая распознается N-белком бактериофага лямбда. Транскрипция генов, расположенных ниже по ходу транскрипции в ранних оперонах бактериофага, требует промотор-проксимального элемента, известного как nut. Этот сайт действует in cis в форме РНК для сборки транскрипционного анти-терминального комплекса, который состоит из белка N бактериофага лямбда и хозяйских факторов. РНК nut-сайта содержит небольшую структуру петля-на-стебле, называемую boxB. Последовательность шпильки РНК boxB известна в настоящей области техники как прерывистый палиндром с потенциалом для образования шпильки (петля-на-стебле). Ее последовательность варьирует у родственников бактериофага лямбда, которые кодируют различные геном-специфические гомологи N. Ни Vogel et al. (2014), ни Montiel-Gonzalez et al. (2013) не используют фермент ADAR млекопитающего, присутствующий в клетке, причем фермент ADAR содержит природный связывающий dsRNA домен, который содержится в ферменте дикого типа. Vogel et al. (2014) использует генетически сконструированный слитый белок, содержащий домен аденозиндеаминазы ADAR1 или 2, слитый с доменом SNAP-tag, а Montiel-Gonzalez et al. использует генетически сконструированный слитый белок, содержащий домен аденозиндеаминазы белка hADAR2, слитый с доменом распознавания boxB белка N бактериофага лямбда. В отличие от предшествующего уровня техники, AON по настоящему изобретению использует фермент ADAR млекопитающего, присутствующий в клетке, причем фермент ADAR содержит свой природный связывающий dsRNA домен, который содержится в ферменте дикого типа. Поэтому нет необходимости включать по-

следовательность шпильки РНК boxB, 5'-концевой Об-бензилгуанин, 5'-концевую amino-модификацию или домен SNAP-tag в AON по настоящему изобретению, чтобы позволить мобилизацию ADAR. Следовательно, AON согласно настоящему изобретению имеют определенные преимущества по сравнению с олигонуклеотидами, описанными в публикациях Vogel et al. (2014) и Montiel-Gonzalez et al (2013). AON согласно настоящему изобретению могут использовать эндогенные клеточные пути и природные доступные ферменты ADAR для специфического редактирования целевого аденозина в целевой последовательности РНК. Согласно одному варианту осуществления AON по настоящему изобретению не связан ковалентно с человеческой Об-алкилгуанин-ДНК-алкилтрансферазой. Предпочтительно, AON по настоящему изобретению не связан ковалентно с полипептидом. Согласно другому аспекту AON по настоящему изобретению AON не содержит 5'-кэп. У эукариотов 5'-кэп состоит из гуанинового нуклеотида, присоединенного к РНК через 5'-5'-трифосфатную связь. Этот гуанозин метилирован в положении 7 и упоминается как 7-метилгуанозин. Как раскрыто в настоящем документе, одноцепочечные индуцирующие редактирование РНК олигонуклеотиды по настоящему изобретению способны дезаминировать специфический нуклеотид целевого аденозина в целевой последовательности РНК. В идеале, только один аденозин дезаминирован. Альтернативно, дезаминируют 1, 2 или 3 аденозиновых нуклеотида, но предпочтительно только один. Рассматривая особенности AON по настоящему изобретению вместе, нет необходимости в модифицированной рекомбинантной экспрессии ADAR, нет необходимости в конъюгированных объектах, прикрепленных к AON, или наличии длинных мобилизующих участков, которые не являются комплементарными целевой последовательности РНК. Кроме того, AON по настоящему изобретению позволяет специфически дезаминировать целевой аденозин, присутствующий в целевой последовательности РНК, до инозина природным ферментом ADAR, содержащим природный связывающий dsRNA домен, который содержится в ферменте дикого типа, без риска неизбирательного редактирования в другом месте в комплексе РНК/AON.

Мобилизация цитидиндезаминазы к целевому сайту работает так же, как и для аденозиндезаминаз hADAR1 и hADAR2. Однако цитидиндезаминазы характеризуются различными требованиями к связыванию и распознают разные структуры в их целевых последовательностях РНК, которые определяют редактирование цитидина. Одна особенно хорошо изученная цитидиндезаминаза представляет собой Arobec1 человека. Общий принцип редактирования РНК с использованием олигонуклеотидной конструкции для нацеливания на сайт редактирования и для мобилизации резидентного, естественно присутствующего, редактирующего объекта остается тем же самым для цитидиндезаминаз и представляет собой часть настоящего изобретения, раскрытого и заявленного в настоящем документе.

Анализ природных мишеней ферментов ADAR показал, что они, как правило, включают в себя несоответствия между двумя нитями, которые образуют спираль РНК, отредактированную ADAR1 или ADAR2. Было высказано предположение, что эти несоответствия повышают специфичность реакции на редактирование (Stefl et al., 2006, Structure, 14(2):345-355; Tian et al., 2011, Nucleic Acids Res., 39(13):5669-5681). Характеристика оптимальных паттернов спаренных/несоответствующих нуклеотидов между AON и целевой РНК также имеет решающее значение для разработки эффективной терапии AON на основе ADAR. Улучшенной особенностью AON по настоящему изобретению является использование специфических нуклеотидных модификаций в predetermined точках для обеспечения стабильности, а также надлежащего связывания и активности ADAR. Эти изменения могут варьировать и могут включать в себя модификации в основной цепи AON, в фрагменте сахара нуклеотидов, а также в нуклеотидных основаниях. Они также могут быть вариативно распределены по всей последовательности AON, в зависимости от мишени и вторичных структур. Могут потребоваться конкретные химические модификации для поддержки взаимодействий различных аминокислотных остатков в РНК-связывающих доменах ферментов ADAR, а также в доменах дезаминазы. Например, фосфоротиоатные связи между нуклеотидами и/или 2'-О-метил-модификациями могут переноситься в некоторых частях AON, в то время как в других частях их следует избегать, чтобы не нарушать критические взаимодействия фермента с фосфатом и/или 2'-ОН. Часть этих правил дизайна руководствуется опубликованными структурами ADAR2, в то время как другие должны быть определены эмпирически. Для ADAR1 и ADAR2 могут существовать различные предпочтения. Модификации также следует выбирать таким образом, чтобы они предотвращали деградацию AON. Специфические нуклеотидные модификации также могут быть необходимы для усиления активности редактирования на субстратных РНК, где целевая последовательность не является оптимальной для редактирования ADAR. В предыдущей работе было установлено, что некоторые контексты последовательности поддаются редактированию в большей степени. Например, целевая последовательность 5'-UAG-3' (с мишенью А в середине) содержит наиболее предпочтительные нуклеотиды ближайших соседей для ADAR2, тогда как целевая последовательность 5'-CAA-3' не подвергается неблагоприятному воздействию (Schneider et al., 2014, Nucleic Acids Res., 42(10):e87). Недавний структурный анализ домена дезаминазы ADAR2 указывает на возможность улучшения редактирования путем тщательного выбора нуклеотидов, которые противоположны целевому тринуклеотиду. Например, целевая последовательность 5'-CAA-3', спаренная с последовательностью 3'-GCU-5' на противоположной нити (с несоответствием А-С, образованным в середине), неблагоприятна, поскольку основание гуанозин стерически сталкивается с аминокислотной боковой цепью ADAR2. Однако в настоящем документе постулируется, что

меньшее нуклеотидное основание, такое как инозин, может потенциально лучше вписываться в это положение, не вызывая стерических столкновений, сохраняя при этом потенциал спаривания основания для противоположного цитидина. Модификации, которые могут усилить активность субоптимальных последовательностей, предусматривают использование модификаций остовов, которые увеличивают гибкость АОН или, наоборот, заставляют его принимать конформацию, которая способствует редактированию.

#### **Определения терминов, используемых в настоящем документе**

Используемые в настоящем документе термины "аденин", "гуанин", "цитозин", "тимин", "урацил" и "гипоксантин" (нуклеотидное основание в инозине) относятся к нуклеотидам как таковым.

Термины "аденозин", "гуанозин", "цитидин", "тимидин", "уридин" и "инозин" относятся к нуклеотидам, связанным с (дезоксир)рибозиловым сахаром.

Термин "нуклеозид" относится к нуклеотидному основанию, связанному с (дезоксир)рибозиловым сахаром.

Термин "нуклеотид" относится к соответствующему нуклеотидному основанию (дезоксир)рибозилфосфолинкеру, а также к любым химическим модификациям рибозного фрагмента или фосфогруппы. Таким образом, этот термин будет предусматривать нуклеотид, включающий в себя блокированный рибозильный фрагмент (содержащий мостик 2'-4', содержащий метиленовую группу или любую другую группу, хорошо известную в настоящей области техники), нуклеотид, включающий в себя линкер, содержащий фосфодиэфир, фосфотриэфир, фосфоро(ди)тиоат, метилфосфонаты, фосфорамидатные линкеры и тому подобное.

Иногда термины аденозин и аденин, гуанозин и гуанин, цитозин и цитидин, урацил и уридин, тимин и тимидин, инозин и гипоксантин используются взаимозаменяемо, чтобы обозначить соответствующее нуклеотидное основание, нуклеозид или нуклеотид.

Иногда термины нуклеотидное основание, нуклеозид и нуклеотид используются взаимозаменяемо, если контекст явно не требует иного. Термины "рибонуклеозид" и "дезоксирибонуклеозид" или "рибоза" и "дезоксирибоза" являются такими, как используется в настоящей области техники.

Всякий раз, когда упоминается "олигонуклеотид", подразумеваются как олигорибонуклеотиды, так и дезоксиолигорибонуклеотиды, если контекст не диктует иное. Всякий раз, когда упоминается "олигорибонуклеотид", он может содержать основания А, G, C, U или I. Всякий раз, когда упоминается "дезоксирибонуклеотид", он может содержать основания А, G, C, T или I. Согласно предпочтительному аспекту АОН по настоящему изобретению представляет собой олигорибонуклеотид, который может содержать химические модификации.

Когда упоминаются нуклеотиды в олигонуклеотидной конструкции, они содержат цитозин, 5-метилцитозин, 5-гидроксиметилцитозин и β-D-глюкозил-5-гидроксиметилцитозин; когда упоминается аденин, включены N<sub>6</sub>-метиладенин и 7 метиладенин; когда упоминается урацил, включены дигидроурацил, 4-тиоурацил и 5-гидроксиметилурацил; когда упоминается гуанин, включен 1-метилгуанин.

Когда упоминаются нуклеозиды или нуклеотиды, включаются производные рибофуранозы, такие как 2'-дезоксид, 2'-гидроксид и 2'-О-замещенные варианты, такие как 2'-О-метил, а также другие модификации, включая в себя 2'-4' мостиковые варианты.

Всякий раз, когда упоминаются олигонуклеотиды, связи между двумя мононуклеотидами могут представлять собой фосфодиэфирные связи, а также их модификации, включая в себя фосфодиэфир, фосфотриэфир, фосфоро(ди)тиоат, метилфосфонат, фосфор-амидатные линкеры и тому подобное.

Термин "содержащий" охватывает "включающий в себя", а также "состоящий", например, композиция, "содержащая X", может состоять исключительно из X или может включать в себя что-то дополнительное, например, X+Y.

Термин "приблизительно" по отношению к числовому значению x является необязательным и означает, например, x+10%.

Слово "по существу" не исключает "полностью", например, композиция, которая "по существу не содержит Y", может быть полностью свободна от Y. В соответствующих случаях слово "по существу" может быть опущено из определения настоящего изобретения.

Используемый в настоящем документе термин "комплементарный" относится к тому факту, что АОН гибридизуется в физиологических условиях с целевой последовательностью. Этот термин не означает, что каждый нуклеотид в АОН характеризуется идеальным спариванием с его противоположным нуклеотидом в целевой последовательности. Другими словами, хотя АОН может быть комплементарным целевой последовательности, могут быть несоответствия, неоднозначные соответствия и/или выпуклости между АОН и целевой последовательностью, тогда как в физиологических условиях АОН все еще гибридизуется с целевой последовательностью, так что редактирующие клеточную РНК ферменты могут редактировать целевой аденозин. Таким образом, термин "по существу комплементарный" также означает, что, несмотря на наличие несоответствий, неоднозначных соответствий и/или выпуклостей, АОН содержит достаточное количество нуклеотидов для соответствия между АОН и целевой последовательностью, так что в физиологических условиях АОН гибридизуется с целевой РНК. Как показано в настоящем документе, АОН может быть комплементарным, но может также содержать одно или более несоответствий, неоднозначных соответствий и/или выпуклостей с целевой последовательностью, если в фи-

зиологических условиях AON способен гибридизоваться с его мишенью.

Термин "ниже по ходу транскрипции" в отношении последовательности нуклеиновой кислоты означает далее вдоль последовательности в направлении 3'; термин "выше против хода транскрипции" означает обратное. Таким образом, в любой последовательности, кодирующей полипептид, стартовый кодон находится выше против хода транскрипции от стоп-кодона в смысловой цепи, но находится ниже по ходу транскрипции от стоп-кодона в антисмысловой цепи.

Ссылки на "гибридизацию", как правило, относятся к специфической гибридизации и исключают неспецифическую гибридизацию. Специфическая гибридизация может происходить в экспериментальных условиях, выбранных с использованием способов, хорошо известных в настоящей области техники, для обеспечения того, чтобы большинство стабильных взаимодействий между зондом и мишенью находилось там, где зонд и мишень характеризуются идентичностью последовательности, составляющей по меньшей мере 70%, предпочтительно по меньшей мере 80%, более предпочтительно по меньшей мере 90%.

Термин "несоответствие" используется в настоящем документе для обозначения противоположных нуклеотидов в комплексе двухцепочечной РНК, которые не образуют идеальных пар оснований в соответствии с правилами спаривания оснований Уотсона-Крика. Несовпадающими нуклеотидами являются пары G-A, C-A, U-C, A-A, G-G, C-C, U-U. Согласно некоторым вариантам осуществления AON по настоящему изобретению содержат менее четырех несоответствий, например, 0, 1 или 2 несоответствия. Неоднозначные пары оснований представляют собой: пары оснований G-U, I-U, I-A и I-C.

AON согласно настоящему изобретению может быть химически модифицирован практически полностью, например, путем обеспечения всех нуклеотидов 2'-О-метилованным фрагментом сахара (2'-ОМе). Однако нуклеотид, противоположный целевому аденозину, не содержит модификацию 2'-ОМе и согласно еще одному предпочтительному аспекту по меньшей мере один, а согласно предпочтительному аспекту, оба соседних нуклеотида, окружающие по бокам каждый нуклеотид, противоположный целевому аденозину, дополнительно не содержат модификация 2'-ОМе. Полная модификация, в которой все нуклеотиды в AON содержат модификацию 2'-ОМе, приводит к нефункциональному олигонуклеотиду по мере того, как происходит редактирование РНК, по-видимому, потому, что оно препятствует активности ADAR в целевом положении. Как правило, аденозин в целевой РНК может быть защищен от редактирования путем обеспечения противоположного нуклеотида группой 2'-ОМе или путем обеспечения гуанина или аденина в качестве противоположного основания, так как эти две нуклеотидные группы также могут уменьшить редактирование противоположного аденозина.

В области олигонуклеотидов известны различные химические вещества и модификации, которые могут быть легко использованы в соответствии с настоящим изобретением. Регулярные межнуклеозидные связи между нуклеотидами могут быть изменены моно- или дитиолирование фосфодиэфирных связей с образованием сложных эфиров фосфоротиоата или сложных эфиров фосфородитиоата соответственно. Возможны и другие модификации межнуклеозидных связей, включая в себя амидирование и пептидные линкеры. Согласно предпочтительному аспекту AON по настоящему изобретению содержат одну, две, три, четыре или более фосфоротиоатных связей между наиболее концевыми нуклеотидами AON (следовательно, предпочтительно на обоих концах 5' и 3'), что означает, что в случае четырех фосфоротиоатных связей, конечные пять нуклеотидов связаны соответственно. Специалисту в настоящей области техники будет понятно, что количество таких связей может изменяться на каждом конце, в зависимости от целевой последовательности или на основе других аспектов, таких как токсичность.

Сахар рибоза может быть модифицирован путем замещения 2'-О-фрагмента на низший алкил (C<sub>1-4</sub>, такой как 2'-О-Ме), алкенил (C<sub>2-4</sub>), алкинил (C<sub>2-4</sub>), метоксиэтил (2'-МОЕ) или другой заместитель. Предпочтительными заместителями 2'-ОН-группы являются метильная, метоксиэтильная или 3,3'-диметилаллильная группа. Последняя известна тем, что обладает свойством ингибировать чувствительность нуклеазы из-за ее объемности, одновременно повышая эффективность гибридизации (Angus & Sprout, FEBS, 1993, vol. 325, № 1, 2, 123-7). Альтернативно могут быть применены последовательности закрытых нуклеиновых кислот (LNA), содержащие 2'-4' внутримолекулярную мостиковую (как правило, метиленовый мостик между 2' кислородом и 4' углеродом) связь внутри кольца рибозы. Пуриновые нуклеотидные основания и/или пиримидиновые нуклеотидные основания могут быть модифицированы для изменения их свойств, например, путем аминирования или дезаминирования гетероциклических колец. Точные химические вещества и форматы могут зависеть от олигонуклеотидной конструкции и от применения и могут быть разработаны в соответствии с пожеланиями и предпочтениями специалистов в настоящей области техники.

AON согласно настоящему изобретению, как правило, должен быть длиннее, чем 10 нуклеотидов, предпочтительно более чем 11, 12, 13, 14, 15, 16, еще более предпочтительно более чем 17 нуклеотидов. Согласно одному варианту осуществления AON согласно настоящему изобретению длиннее, чем 20 нуклеотидов. Олигонуклеотид согласно настоящему изобретению предпочтительно короче, чем 100 нуклеотидов, еще более предпочтительно менее чем 60 нуклеотидов. Согласно одному варианту осуществления AON согласно настоящему изобретению составляет менее чем 50 нуклеотидов. Согласно предпочтительному аспекту олигонуклеотид согласно настоящему изобретению содержит от 18 до 70 нуклеотидов, более предпочтительно содержит от 18 до 60 нуклеотидов и еще более предпочтительно содержит от

18 до 50 нуклеотидов. Следовательно, согласно наиболее предпочтительному аспекту олигонуклеотид по настоящему изобретению содержит 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 или 50 нуклеотидов.

В настоящей области техники известно, что редактирующие РНК объекты (такие как ферменты ADAR человека) редактируют структуры dsRNA с различной специфичностью, в зависимости от ряда факторов. Одним из важных факторов является степень комплементарности двух нитей, составляющих последовательность dsRNA. Совершенная комплементарность двух нитей, как правило, приводит к тому, что каталитический домен hADAR дезаминирует аденозины недискриминационным образом, более или менее реагируя на любой аденозин, с которым он сталкивается. Специфичность hADAR1 и 2 может быть увеличена путем введения химических модификаций и/или обеспечения ряда несоответствий в dsRNA, которые, по-видимому, помогают расположить связывающие dsRNA домены таким образом, который еще не был четко определен. Кроме того, сама реакция дезаминирования может быть усилена за счет предоставления AON, который содержит несоответствие, противоположное редактируемому аденозину. Несопответствие предпочтительно создается путем обеспечения нацеливающего участка, содержащего цитидин, противоположный редактируемому аденозину. В качестве альтернативы также можно использовать уридины напротив аденозина, что по понятным причинам не приведет к "несоответствию" из-за пары U и A. При дезаминировании аденозина в целевой нити целевая нить будет получать инозин, который для большинства биохимических процессов "считывается" биохимическим механизмом клетки в виде G. Следовательно, после преобразования A в I несоответствие было разрешено, поскольку I отлично способен к образованию пары оснований с противоположным C в нацеливающем участке олигонуклеотидной конструкции в соответствии с настоящим изобретением. После того как несоответствие было разрешено благодаря редактированию, субстрат высвобождается и редактирующий олигонуклеотидную конструкцию комплекс объектов освобождается от целевой последовательности РНК, которая затем становится доступной для последующих биохимических процессов, таких как сплайсинг и трансляция. Также эта скорость ассоциации/диссоциации важна, поскольку целевой олигонуклеотид не должен быть слишком сильно связан с целевой РНК.

Желаемый уровень специфичности редактирования целевой последовательности РНК может зависеть от мишени. Следуя инструкциям, приведенным в настоящей патентной заявке, специалисты в настоящей области техники смогут разработать комплементарную часть олигонуклеотида в соответствии с их потребностями и экспериментальным путем получить желаемый результат.

Олигонуклеотид по настоящему изобретению, как правило, будет содержать нормальные нуклеотиды A, G, U и C, но может также включать в себя инозин (I), например, вместо одного или более нуклеотидов G.

Чтобы предотвратить нежелательное редактирование аденозинов в целевой последовательности РНК в области перекрытия с олигонуклеотидной конструкцией, олигонуклеотид может быть химически модифицирован. В настоящей области техники показано, что 2'-О-метилирование рибозильного фрагмента нуклеозида, противоположного аденозину в целевой последовательности РНК, значительно снижает дезаминирование этого аденозина с помощью ADAR (Vogel et al., 2014). Следовательно, путем включения 2'-метокси (2'-ОМЕ) нуклеотидов в желаемое положение олигонуклеотидной конструкции, специфичность редактирования значительно улучшается. Другие 2'-О-замены рибозильной группы, такие как 2'-метоксиэтильные (2'-МОЕ) и 2'-О-диметилаллильные группы, также могут уменьшить нежелательное редактирование соответствующего (противоположного) аденозина в целевой последовательности РНК. Все эти модификации могут быть применены в олигонуклеотидах по настоящему изобретению. Другие химические модификации также легко доступны специалисту, имеющему обычный навык в области синтеза и дизайна олигонуклеотидов. Синтез таких химически модифицированных олигонуклеотидов и их исследование в способах согласно настоящему изобретению не вызывает чрезмерных сложностей, и другие модификации охватываются настоящим изобретением.

Редактирующие РНК молекулы, присутствующие в клетке, как правило, будут белковыми по своей природе, такими как ферменты ADAR, обнаруженные в многоклеточных организмах, включая в себя млекопитающих. Предпочтительно, клеточный редактирующий объект представляет собой фермент, более предпочтительно аденозиндезаминазу или цитидиндезаминазу, еще более предпочтительно аденозиндезаминазу. Наиболее интересны человеческие ADAR, hADAR1 и hADAR2, включая в себя любые их изоформы, такие как hADAR1 p110 и p150. Редактирующие РНК ферменты, известные в настоящей области техники, для которых могут быть сконструированы олигонуклеотидные конструкции в соответствии с настоящим изобретением, включают в себя аденозиндезаминазы, действующие на РНК (ADAR), такие как hADAR1 и hADAR2 у людей или в клетках человека, и цитидиндезаминазы. Человеческий ADAR3 (hADAR3) описан в предшествующем уровне техники, но, как сообщается, не имеет дезаминазной активности. Известно, что hADAR1 существует в двух изоформах; длинная индуцибельная версия интерферона длиной 150 кДа и более короткая версия длиной 100 кДа, которая производится путем альтернативного сплайсинга из общей пре-мРНК. Следовательно, содержание изоформы размером 150 кДа, присутствующей в клетке, может зависеть от интерферона, в частности, интерферона-гамма (IFN-гамма). hADAR1 также индуцируется TNF-альфа. Это дает возможность разработать комбинированную тера-

пию, при которой интерферон-гамма или TNF-альфа и олигонуклеотиды согласно настоящему изобретению вводят пациенту либо в виде комбинированного продукта, либо в виде отдельных продуктов, как одновременно, так и последовательно в любом порядке. Некоторые заболевания могут уже совпадать с повышенным содержанием IFN-гамма или TNF-альфа в определенных тканях пациента, создавая дополнительные возможности для более специфического редактирования для пораженных тканей.

Примерами химических модификаций в AON по настоящему изобретению являются модификации фрагмента сахара, включая в себя сшивающие заместители внутри фрагмента сахара (рибозы) (например, как в LNA или замкнутых нуклеиновых кислотах) путем замещения атома 2'-О-алкильной (например, 2'-О-метильной), алкинильной (2'-О-алкинильной), алкенильной (2'-О-алкенильной), алкоксиалкильной (например, метоксиэтильной, 2'-МОЕ) групп, характеризующихся длиной, указанной выше, и т.п. Кроме того, фосфодиэфирная группа остова может быть модифицирована посредством тиолирования, дитиолирования, амидирования и т.п., чтобы получить фосфоротиоатные, фосфородитиоатные, фосфорамидатные и т.д. межнуклеозидные связи. Межнуклеозидные связи могут быть полностью или частично заменены пептидными связями с выходом последовательности пептидонуклеиновой кислоты и т.п. Альтернативно или дополнительно нуклеотидные основания могут быть модифицированы путем (де)аминирования с получением инозина или 2'6'-диаминопуринов и т.п. Еще одной модификацией может быть метилирование С5 в цитидинном фрагменте нуклеотида для уменьшения потенциальных иммуногенных свойств, которые, как известно, связаны с последовательностями CpG.

В случае, когда комплекс dsRNA мобилизует ферменты ADAR для дезаминирования А в I в целевой последовательности РНК, пара оснований, несоответствие, выпуклость или неоднозначное соответствие между подлежащим редактированию аденозином и противоположным нуклеотидом может содержать аденозин, гуанин, уридин или остаток цитидина, но предпочтительно остаток цитидина. За исключением потенциального несоответствия напротив сайта редактирования (когда не применяется уридин), оставшаяся часть AON может быть полностью комплементарной целевой РНК. Однако, как показано в настоящем документе, согласно некоторым аспектам настоящее изобретение относится к AON, которые содержат ограниченное количество несовершенных соответствий. Специалисту в настоящей области техники будет понятно, что степень, в которой объекты редактирования внутри клетки перенаправляются к другим целевым сайтам, может регулироваться путем изменения аффинности олигонуклеотидов в соответствии с настоящим изобретением для домена распознавания молекулы редактирования. Точная модификация может быть определена с помощью экспериментальных способов и/или посредством вычислительных способов, основанных на структурных взаимодействиях между олигонуклеотидом и доменом распознавания молекулы редактирования.

Дополнительно или альтернативно, степень мобилизации и перенаправления объекта редактирования, находящегося в клетке, может регулироваться дозированием и режимом дозирования олигонуклеотида. Это может быть определено экспериментатором (*in vitro*) или клиницистом, как правило, в I и/или II фазе клинических испытаний.

Настоящее изобретение относится к модификации целевых последовательностей РНК в эукариотических организмах, предпочтительно многоклеточных организмах, более предпочтительных клетках млекопитающих. В принципе настоящее изобретение может быть использовано с клетками любых видов млекопитающих, но оно предпочтительно используется с клеткой человека. Настоящее изобретение может быть использовано с клетками из любого органа, например, кожи, легкого, сердца, почки, печени, поджелудочной железы, кишечника, мышцы, железы, глаза, головного мозга, крови и т.п. Настоящее изобретение особенно подходит для модификации последовательностей в клетках, тканях или органах, вовлеченных в состояние заболевания (человека). Такие клетки включают в себя, без ограничения, эпителиальные клетки легкого или желудочно-кишечного тракта, клетки репродуктивных органов, мышечные клетки, клетки глаза, клетки кожи, клетки таких тканей и органов, как печень, почки, поджелудочная железа, иммунные клетки, раковые клетки, клетки желез, клетки головного мозга и т.п. Настоящее изобретение также может быть использовано с клетками млекопитающих, которые, по своей природе, не присутствуют в организме, например, с клеточной линией или с эмбриональной стволовой (ES) клеткой. Настоящее изобретение может быть использовано с различными типами стволовых клеток, включая в себя плюрипотентные стволовые клетки, тотипотентные стволовые клетки, эмбриональные стволовые клетки, индуцированные плюрипотентные стволовые клетки и т.д. Клетка может находиться *in vitro* или *in vivo*. Одно из преимуществ настоящего изобретения состоит в том, что его можно использовать с клетками *in situ* в живом организме, но его можно также использовать с клетками в культуре. Согласно некоторым вариантам осуществления клетки обрабатывают *ex vivo* и затем вводят в живой организм (например, повторно вводят в организм, из которого они были первоначально получены). Настоящее изобретение также может быть использовано для редактирования целевых последовательностей РНК в клетках внутри так называемого органоида. Органоиды можно рассматривать как трехмерные ткани, полученные *in vitro*, но полученные с использованием конкретных условий для создания отдельных выделенных тканей (например, *Lancaster & Knoblich, Science, 2014, vol. 345, № 6194, 1247125*). В плане терапии они полезны, потому что они могут быть получены *in vitro* из клеток пациента, и органоиды затем могут быть повторно введены пациенту в качестве аутологичного материала, который с меньшей вероят-

ностью будет отторгнут, чем обычный трансплантат. Таким образом, согласно другому предпочтительному варианту осуществления настоящее изобретение может быть осуществлено на органоидах, выращенных из образцов тканей, взятых у пациента (например, из их желудочно-кишечного тракта; см. Sala et al., *J. Surg. Res.*, 2009, 156(2):205-12; а также Sato et al., *Gastroenterology*, 2011, 141:1762-72); при редактировании РНК в соответствии с настоящим изобретением органоиды или стволовые клетки, находящиеся внутри органоидов, могут быть использованы для пересадки обратно пациенту для улучшения функции органа. Подлежащая лечению клетка, как правило, будет иметь генетическую мутацию. Мутация может быть гетерозиготной или гомозиготной. Настоящее изобретение, как правило, будет использоваться для модификации точечных мутаций, таких как мутации N на A, где N может представлять собой G, C, U (T на уровне ДНК), предпочтительно мутации G на A или мутации N на C, где N может представлять собой A, G, U (T на уровне ДНК), предпочтительно мутации U на C. Гены, содержащие представляющие особый интерес мутации, обсуждаются ниже. Однако согласно некоторым вариантам осуществления настоящее изобретение используется противоположным путем посредством введения мутации, связанной с заболеванием, в клеточную линию или животное, чтобы обеспечить полезный исследовательский инструмент для рассматриваемого заболевания. В качестве примера создания модели заболевания авторы настоящего изобретения предоставили олигонуклеотидную последовательность, которая предусматривает набор редактирующей активности в клетке человека для создания мутации в гене CEP290, создавая криптический сайт сплайсинга, который составляет основу для формы врожденного амавроза Лебера (LCA 10), наиболее распространенной формы врожденной детской слепоты.

Мутация, которая должна быть восстановлена посредством редактирования РНК, возможно, возникла на уровне хромосомы или какой-либо другой формы ДНК, такой как митохондриальная ДНК или РНК, включая в себя пре-мРНК, рибосомальную РНК или митохондриальную РНК. Могут быть внесены изменения в целевую РНК возбудителя, включая в себя грибы, дрожжи, паразиты, кинетопластиды, бактерии, фаги, вирусы и т.д., которыми была инфицирована клетка или субъект. Впоследствии редактирование может происходить на уровне РНК на целевой последовательности внутри такой клетки, субъекта или патогена. Некоторые патогены, такие как вирусы, высвобождают свою нуклеиновую кислоту, ДНК или РНК, в клетку инфицированного хозяина (клетку). Другие патогены обитают или циркулируют в зараженном хозяине. Олигонуклеотидные конструкции по настоящему изобретению могут быть использованы для редактирования целевых последовательностей РНК, находящихся в клетке инфицированного эукариотического хозяина, или для редактирования последовательности РНК внутри клетки патогена, проживающего или циркулирующего в эукариотическом хозяине, до тех пор, пока клетки, где должно происходить редактирование, содержат объект редактирования, совместимый с олигонуклеотидной конструкцией, введенной в него.

Без желания быть связанными с теорией, авторы полагают, что редактирование РНК через hADAR1 и hADAR2, как полагают, имеет место на первичных транскриптах в ядре во время транскрипции или сплайсинга или в цитоплазме, где, например, зрелая мРНК, miRNA или ncRNA, могут быть отредактированы. Известно, что различные изоформы редактирующих ферментов локализируются по-разному, например, p110 hADAR1 обнаруживается в основном в ядре, а p150 hADAR1 в цитоплазме. Считается, что редактирование РНК цитидиндеаминазами происходит на уровне мРНК. Редактирование кодонов митохондриальных РНК или некодирующих последовательностей в зрелых мРНК не исключается.

Настоящее изобретение используется для внесения изменения в целевую последовательность РНК в эукариотической клетке с использованием олигонуклеотида, который способен нацеленно воздействовать на подлежащий редактированию сайт и мобилизовать объекты редактирования РНК, находящиеся в клетке, чтобы вызвать реакцию(и) редактирования). Предпочтительными реакциями редактирования являются аденозиновые дезаминирования и цитидиновые дезаминирования, превращающие аденозины в инозины и цитидины в уридины соответственно. Изменения могут быть в 5' или 3' нетранслируемых областях целевой РНК, в (криптических) сайтах сплайсинга, в экзонах (изменение аминокислот в белке, транслированном из целевой РНК, использование кодонов или сплайсинг путем изменения экзонных сайленсеров или энхансеров сплайсинга, путем введения или удаления старт-кодонов или стоп-кодонов), в интронах (изменение сплайсинга путем изменения интронных сайленсеров сплайсинга или интронных энхансеров сплайсинга, точек ветвления) и вообще в любой области, влияющей на стабильность, структуру или функционирование РНК. Целевая последовательность РНК может содержать мутацию, которую можно исправить или изменить, такую как точечная мутация (транзиция или трансверсия). Альтернативно, целевая последовательность РНК преднамеренно подвергают мутации для создания измененного фенотипа (или генотипа, в случае организмов на основе РНК, таких как РНК-вирусы), где раньше не было мутаций. Например, могут быть получены клеточные линии или животные, которые несут изменения (мутации) в целевой последовательности РНК, которые могут использоваться в анализах или в качестве (животных, органоидных и др.) модельных систем для изучения заболевания, исследования экспериментальных соединений против заболевания и т.п. Олигонуклеотидные конструкции и способы согласно настоящему изобретению могут быть использованы в системах высокопроизводительного скрининга (в формате массивов) для создания банков клеток с большим количеством целевых РНК, например, кодирования большого разнообразия белковых изоформ, для дальнейших экспериментов, включая в себя



скрининг соединений, белковую инженерию и тому подобное.

Целевая РНК может представлять собой любую клеточную или вирусную последовательность РНК, но чаще она представляет собой пре-мРНК или мРНК с функцией кодирования белка.

Исключительно для облегчения упоминания и без намерения ограничить настоящее изобретение представлена табл. 1 для иллюстрации потенциальных изменений кодонов, которые могут быть вызваны редактированием аденозиндезаминазы, направленным олигонуклеотидами по настоящему изобретению. Табл. 1, в частности, не должна интерпретироваться как ограничение применимости настоящего изобретения к кодирующим последовательностям в любой РНК; как уже отмечалось, настоящее изобретение может быть осуществлено на любой целевой РНК, содержащей аденозин, будь то в кодирующей области, интроне, некодирующем экзоне (таком как 5'- или 3'-нетранслируемый участок), в miRNA, тРНК, рРНК и т.д. Чтобы избежать какого-либо недоразумения в отношении ширины применимости, изменения, которые несущественны ("молчащие") с точки зрения кодирования, могут все еще изменять экспрессию гена определенного белка, поскольку некоторые кодоны для той же аминокислоты могут быть более предпочтительными, чем другие, и могут приводить, например, к отличающейся стабильности транскрипции или эффективности трансляции, в результате чего кодируемый белок становится более или менее многочисленным, чем без изменений.

Таблица 1

Целевой кодон	Аминокислота	Исправленный кодон	Аминокислота
AAA	Lys	GAA	Glu
		AGA	Arg
		GGA	Gly
		AGG	Arg
		GAG	Glu
AAC	Asn	GAC	Asp
		AGC	Ser
		GGC	Gly
AAG	Lys	GAG	Glu
		AGG	Arg
		GGG	Gly
AAU	Arg	GAU	Asp
		AGU	Ser
		GGU	Gly
ACA	Thr	GCA	Ala
		GCG	Ala
ACC	Thr	GCC	Ala
ACG	Thr	GCG	Ala
ACU	Thr	GCU	Ala
AGA	Arg	GGA	Gly
		GGG	Gly
AGC	Ser	GGC	Gly
AGG	Arg	GGG	Gly
AGU	Ser	GGU	Gly

AUA	Ile	GAU	Asp
		AUG	Met
		GUG	Val
AUC	Ile	GUC	Val
AUG	Met	GUG	Val
AUU	Ile	GUU	Val
CAA	Gln	CGA	Arg
		CGG	Arg
CAC	His	CGC	Arg
CAG	Gln	CGG	Arg
CAU	His	CGU	Arg
CCA	Pro		
CGA	Arg		
CUA	Leu		
GAA	Glu	GGA	Gly
		GGG	Gly
GCA	Ala		
GUA	Val		
GGA	Gly		
GAC	Asp	GGC	Gly
GAG	Glu	GGG	Gly
GAU	Asp	GGU	Gly
UAA	Stop		
		UGG	Trp
UCA	Ser		
UGA	Stop	UGG	Trp
UUA	Leu		
UAC	Tyr	UGC	Cys
UAG	Stop	UGG	Trp
UAU	Tyr	UGU	Cys

Целевыми аденозинами, представляющими особый интерес для редактирования с использованием олигонуклеотидов в соответствии с настоящим изобретением, являются те, которые представляют собой часть кодонов для аминокислотных остатков, которые определяют ключевые функции или характеристики, такие как каталитические сайты, сайты связывания для других белков, связывание субстратами, домены локализации, для ко- или посттрансляционной модификации, такой как гликозилирование, гидроксильное, миристоилирование, расщепление белка протеазами (для созревания белка и/или как часть внутриклеточной маршрутизации) и т.д.

Множество генетических заболеваний вызвано мутациями из G в A, и они представляют собой предпочтительные целевые заболевания, поскольку дезаминирование аденозина у мутированного целевого аденозина приведет к превращению мутации в дикий тип. Однако превращение в дикий тип не всегда может быть необходимо для получения положительного эффекта. Модификация из A в G в мишени также может быть полезной, если нуклеотид дикого типа отличается от G. В определенных обстоятельствах это может быть предсказано на основе доказательств, в других это может потребовать некоторого исследования. В определенных обстоятельствах модификация из A в целевой РНК в G, где дикий тип не представляет собой G, может быть молчащей (не транслироваться в другую аминокислоту) или иным образом незначимой (например, аминокислота замещена, но она представляет собой консервативную замену, которая не нарушает структуру и функцию белка), или аминокислота представляет собой часть функционального домена, который обладает определенной устойчивостью к изменениям. Если переход

из А в G, вызванный редактированием в соответствии с настоящим изобретением, относится к некодирующей РНК или некодирующей части РНК, это может также быть несущественным или менее серьезным, чем исходная мутация. Специалисты в настоящей области техники поймут, что применимость настоящего изобретения очень широка и даже не ограничена профилактикой или лечением заболеваний. Настоящее изобретение также может быть использовано для модификации транскриптов для изучения ее влияния, даже если или особенно когда такая модификация индуцирует заболевание, например, в клетке или модели животного, отличного от человека. Предпочтительными примерами генетических заболеваний, которые могут быть предотвращены и/или подвергаться лечению олигонуклеотидами согласно настоящему изобретению, являются любые заболевания, при которых модификация одного или более аденозинов в целевой РНК приведет к (потенциально) полезному изменению.

Транскрибированные последовательности РНК, которые представляют собой потенциальные целевые последовательности РНК в соответствии с настоящим изобретением, содержащие представляющие особый интерес мутации, включают в себя, без ограничения, транскрибируемые из гена CFTR (муковисцидозный регулятор трансмембранной проводимости), дистрофии, хантингтин, нейрофибромин 1, нейрофибромин 2,  $\beta$ -глобиновую цепь гемоглобина, CEP290 (центросомальный белок 290 кДа), ген HEXA  $\beta$ -гексозаминидазы А и любой из генов Usher (например, USH2A, кодирующий Usherin), ответственный за форму генетической слепоты, называемой синдромом Ушера. Более подробный список представлен ниже. Целевая последовательность будет выбрана соответствующим образом, и олигонуклеотидная конструкция будет включать желаемую модификацию для коррекции мутации. Специалисты в области мутаций CF признают, что в гене CFTR известны от 1000 до 2000 мутаций, включающих в себя R117H, G542X, G551D, R553X, W1282X HN1303K.

В общем, мутации в любой целевой РНК, которая может быть обращена вспять с использованием олигонуклеотидных конструкций в соответствии с настоящим изобретением, представляют собой мутации из G в А, в случае мобилизации аденозиндезаминазы и мутации из U в C в случае мобилизации цитидиндезаминазы, а олигонуклеотидные конструкции могут соответственно. Мутации, которые могут быть нацелены с использованием олигонуклеотидных конструкций в соответствии с настоящим изобретением, также включают в себя из C в А, из U в А (из T в А на уровне ДНК) в случае мобилизации аденозиндезаминаз и мутаций из А в C и из O в C в случае мобилизации цитидиндезаминаз. Хотя редактирование РНК в последних обстоятельствах может не обязательно возвращать мутацию в дикий тип, отредактированный нуклеотид может привести к улучшению по сравнению с исходной мутацией. Например, мутация, которая вызывает в рамке считывания стоп-кодон, приводящий к укороченному белку при трансляции, может быть изменена на кодон, кодирующий аминокислоту, которая не может быть исходной аминокислотой в этом положении, но это приводит к возникновению (полноразмерного) белка, по меньшей мере с некоторой функциональностью, по меньшей мере более функционального, чем усеченный белок.

Целевая последовательность является эндогенной для эукариотической клетки, предпочтительно клетки млекопитающего, более предпочтительно человеческой клетки. Таким образом, целевая последовательность не представляет собой, например, трансгенный или маркерный ген, который был искусственно введен в какой-то момент в истории клетки, а скорее представляет собой геном, который естественно присутствует в клетке (будь то в мутантной или не мутантной форме).

Настоящее изобретение не ограничивается корректирующими мутациями, так как вместо этого оно может быть полезным для изменения последовательности дикого типа в мутированную последовательность путем применения олигонуклеотидов в соответствии с настоящим изобретением. Одним из примеров, когда может быть выгодно модифицировать аденозин дикого типа, представляет собой введение пропуска экзона, например, путем модификации аденозина, который представляет собой сайт ветвления, необходимый для сплайсинга указанного экзона. Другим примером является то, где аденозин определяет или представляет собой часть последовательности распознавания для связывания белка или участвует во вторичной структуре, определяющей стабильность мРНК. Как отмечено выше, поэтому настоящее изобретение может быть использовано для предоставления инструментов исследования заболеваний, введения новых мутаций, которые менее вредны, чем существующие мутации, и т.д.

Количество вводимого олигонуклеотида, дозировка и режим дозирования могут варьировать от типа клеток к типу клеток, подлежащего лечению заболевания, целевой популяции, способа введения (например, системного и местного), тяжести заболевания и приемлемого уровня побочной активности, но они могут и должны оцениваться экспериментальным способом во время исследования *in vitro* в доклинических и клинических испытаниях. Испытания являются особенно простыми, когда модифицированная последовательность приводит к легко обнаруживаемому фенотипическому изменению. Возможно, что более высокие дозы олигонуклеотида могут конкурировать за связывание с объектом редактирования нуклеиновой кислоты (например, ADAR) в клетке, тем самым истощая количество объекта, который может принимать участие в редактировании РНК, но в обычных испытаниях дозирования будут выявлены любые такие эффекты для данного олигонуклеотида и заданной мишени.

Один подходящий способ испытания предусматривает доставку олигонуклеотидной конструкции к

клеточным линиям или исследуемому организму, а затем последующее взятие образцов биопсии в различные моменты времени. Последовательность целевой РНК может быть оценена в образце биопсии, и можно легко следить за количеством клеток, имеющих модификацию. После того, как это испытание будет выполнено один раз, информация может быть сохранена, и будущая доставка может быть выполнена без необходимости брать образцы биопсии.

Таким образом, способ по настоящему изобретению может предусматривать стадию идентификации наличия желаемого изменения в последовательности целевой РНК клетки, тем самым подтверждая, что целевая последовательность РНК была модифицирована. Эта стадия, как правило, предусматривает секвенирование соответствующей части целевой РНК или ее копии кДНК (или копии кДНК продукта ее сплайсинга в случае, если целевая РНК представляет собой пре-мРНК), как обсуждалось выше, и изменение последовательности может быть легко проверено. Альтернативно, изменение может быть оценено на уровне белка (длина, гликозилирование, функция или т.п.) или с помощью некоторого функционального считывания, такого как (индуцируемый) ток, когда белок, кодируемый целевой последовательностью РНК представляет собой ионный канал, например. В случае функции CFTR специалисту в настоящей области техники хорошо известна анализируемая камера Ussing или тест NPD у млекопитающего, включая в себя человека, для оценки восстановления или усиления функции.

После редактирования РНК в клетке модифицированная РНК может со временем растворяться, например, из-за деления клеток, ограниченного периода полураспада отредактированных РНК и т.д. Таким образом, в практических терапевтических терминах способ по настоящему изобретению может предусматривать повторение доставки олигонуклеотидной конструкции до тех пор, пока не будет изменено достаточное количество целевой РНК, чтобы обеспечить ощутимую пользу пациенту и/или сохранить преимущества с течением времени.

Олигонуклеотиды по настоящему изобретению особенно подходят для терапевтического применения, и поэтому настоящее изобретение обеспечивает фармацевтическую композицию, содержащую олигонуклеотид по настоящему изобретению и фармацевтически приемлемый носитель. Согласно некоторым вариантам осуществления настоящего изобретения фармацевтически приемлемый носитель может представлять собой просто физиологический раствор. Может быть полезно быть изотоническим или гипотоническим, особенно для легочной доставки. Настоящее изобретение также обеспечивает устройство доставки (например, шприц, ингалятор, распылитель), который содержит фармацевтическую композицию по настоящему изобретению.

В настоящем изобретении также предусмотрен олигонуклеотид по настоящему изобретению для применения в способе внесения изменения в целевую последовательность РНК в клетке млекопитающего, предпочтительно клетке человека, как описано в настоящем документе. Аналогично в настоящем изобретении предусмотрено применение олигонуклеотидной конструкции по настоящему изобретению при изготовлении лекарственного средства для осуществления изменения в целевой последовательности РНК в клетке млекопитающего, предпочтительно клетке человека, как описано в настоящем документе.

Настоящее изобретение также относится к способу дезаминирования по меньшей мере одного специфического целевого аденозина, присутствующего в целевой последовательности РНК в клетке, причем указанный способ предусматривает следующие стадии: предоставление указанной клетки с AON согласно настоящему изобретению; обеспечение возможности захвата клеткой указанного AON; обеспечение возможности отжига указанный AON с целевой последовательностью РНК; обеспечение возможности ферменту ADAR млекопитающего, содержащему природный связывающий dsRNA домен, который обнаружен в ферменте дикого типа, дезаминировать указанный целевой аденозин в указанной целевой РНК последовательности до инозина; и необязательно идентификация наличия указанного инозина в последовательности РНК. Введение AON в соответствии с настоящим изобретением в клетку осуществляют с помощью общих способов, известных специалисту в настоящей области техники. После дезаминирования считывание эффекта (изменения целевой последовательности РНК) может контролироваться различными способами. Следовательно, стадия идентификации того, действительно ли дезаминирование целевого аденозина имеет место, в целом зависит от положения целевого аденозина в целевой последовательности РНК и эффекта, который возникает в результате присутствия аденозина (точечная мутация, ранний стоп-кодон, aberrантный сайт сплайсинга, альтернативный сайт сплайсинга, неправильное сворачивание полученного белка и т.д.). Следовательно, согласно предпочтительному аспекту в зависимости от конечного эффекта дезаминирования превращения из А в I, стадия идентификации предусматривает: секвенирование целевой РНК; оценку наличия функционального, удлиненного, полноразмерного белка и/или белка дикого типа, когда указанный целевой аденозин находится в стоп-кодоне UGA или UAG, который редактируется до кодона UGG посредством указанного дезаминирования; оценку наличия функционального, удлиненного, полноразмерного белка и/или белка дикого типа, когда два целевых аденозина расположены в стоп-кодоне UAA, который редактируется до кодона UGG через дезаминирование обоих целевых аденозинов; оценку того, был ли изменен сплайсинг пре-мРНК указанным дезаминированием; или использование функционального считывания, в котором целевая РНК после указанного дезаминирования кодирует функциональный, полноразмерный, удлиненный белок и/или белок дикого типа. В случае, если существует стоп-кодон UAA, это означает, что оба аденозина должны быть дезами-

нированы. Следовательно, настоящее изобретение также относится к олигонуклеотидам и способам, при которых два аденозина, которые находятся рядом друг с другом, совместно дезаминированы с помощью редактирующего РНК фермента, такого как ADAR. В этом конкретном случае стоп-кодон UAA преобразуется в кодирующий Trp кодон UGG (см. табл. 1). Поскольку дезаминирование аденозина в инозин может приводить к белку, который больше не страдает от мутированного А в целевом положении, идентификация дезаминирования в инозин также может представлять собой функциональное считывание, например, оценку того, присутствует ли функциональный белок, или даже оценку того, что заболевание, вызванное присутствием аденозина, (частично) регрессировано. Функциональная оценка для каждого из заболеваний, указанных в настоящем документе, будет в основном осуществляться способом, известным специалисту в настоящей области техники. Когда присутствие целевого аденозина вызывает aberrантный сплайсинг, считывание может представлять собой оценку того, происходит ли aberrантный сплайсинг или нет, или стал меньше. С другой стороны, когда дезаминирование целевого аденозина необходимо для введения сайта сплайсинга, то аналогичные подходы могут быть использованы для проверки того, действительно ли имеет место необходимый тип сплайсинга. Очень подходящим способом идентификации наличия инозина после дезаминирования целевого аденозина является, конечно, RT-PCR и секвенирование с использованием способов, которые хорошо известны специалисту в настоящей области техники.

Олигонуклеотид согласно настоящему изобретению соответствующим образом вводится в водный раствор, например, солевой раствор, или в суспензию, необязательно содержащую добавки, вспомогательные вещества и другие ингредиенты, совместимые с фармацевтическим использованием, в концентрациях от 1 нг/мл до 1 г/мл, предпочтительно от 10 нг/мл до 500 мг/мл, более предпочтительно от 100 нг/мл до 100 мг/мл. Дозировка может составлять от приблизительно 1 мкг/кг до приблизительно 100 мг/кг, предпочтительно от приблизительно 10 мкг/кг до приблизительно 10 мг/кг, более предпочтительно от приблизительно 100 мкг/кг до приблизительно 1 мг/кг. Введение может осуществляться путем ингаляции (например, путем распыления), интраназально, перорально, путем инъекции или инфузии, внутривенно, подкожно, внутривожно, внутрикраниально, внутримышечно, внутритрахеально, внутрибрюшинно, внутриванально, путем прямой инъекции в опухоль и т.п. Введение может быть в твердой форме в виде порошка, таблетки или в любой другой форме, совместимой с фармацевтическим использованием у людей.

Настоящее изобретение особенно подходит для лечения генетических заболеваний, таких как муковисцидоз, альбинизм, дефицит альфа-1-антитрипсина (A1AT), болезнь Альцгеймера, боковой амиотрофический склероз, астма,  $\beta$ -талассемия, синдром Кадасила, болезнь Шарко-Мари-Тута, хроническая обструктивная болезнь легких (COPD), дистальная спинальная мышечная атрофия (DSMA), мышечная дистрофия Дюшенна/Беккера, дистрофический буллезный эпидермолиз, буллезный эпидермолиз, болезнь Фабри, связанные с фактором V Лейдена нарушения, семейный аденоматозный полипоз, галактоземия, болезнь Гоше, дефицит глюкоза-6-фосфатдегидрогеназы, гемофилия, наследственный гемохроматоз, синдром Хантера, болезнь Хантингтона, синдром Гурлера, воспалительное заболевание кишечника (IBD), синдром наследуемой полиаглютинации, врожденный амавроз Лебера, синдром Леш-Нихана, синдром Линча, синдром Марфана, мукополисахаридоз, мышечная дистрофия, миотоническая дистрофия I и II типов, нейрофиброматоз, болезнь Ниманна-Пика типа A, B и C, связанный с NY-eso1 рак, болезнь Паркинсона, синдром Пейтца-Егерса, фенилкетонурия, болезнь Помпе, первичное цилиарное заболевание, нарушения, связанные с протромбиновой мутацией, такие как мутация протромбина G20210A, легочная гипертензия, ретинит пигментоза, болезнь Сандхоффа, синдром тяжелой комбинированной иммунной недостаточности (SCID), серповидноклеточная анемия, спинальная мышечная атрофия, болезнь Старгардта, болезнь Тай-Сакса, синдром Ушера, связанный с X-хромосомой иммунодефицит, различные формы рака (например, связанный с BRCA1 и 2 рак молочной железы и рак яичников) и т.п.

Согласно некоторым вариантам осуществления олигонуклеотидная конструкция может доставляться системно, но более типично доставлять олигонуклеотид в клетки, в которых наблюдается фенотип целевой последовательности. Например, мутации в CFTR вызывают муковисцидоз, который прежде всего наблюдается в эпителиальной ткани легкого, поэтому в отношении целевой последовательности CFTR предпочтительно доставлять олигонуклеотидную конструкцию специфически и непосредственно в легкие. Это может быть удобно достигнуто путем ингаляции, например, порошка или аэрозоля, как правило, с использованием распылителя. Особенно предпочтительными являются распылители, которые используют так называемое вибрирующее сито, включая в себя PARI eFlow (Rapid) или i-neb от Respironics. Изобретатели обнаружили, что ингаляционное использование олигонуклеотидных конструкций может приводить к системному распределению олигонуклеотидной конструкции и поглощению клетками в тканях кишечника, печени, поджелудочной железы, почек и слюнных желез, среди прочих. Поэтому следует ожидать, что ингаляционная доставка олигонуклеотидных конструкций в соответствии с настоящим изобретением может также эффективно нацеливаться на эти клетки, что в случае нацеливания гена CFTR может привести к улучшению желудочно-кишечных симптомов, также связанных с муковисцидозом. Для других целевых последовательностей, в зависимости от заболевания и/или целевого органа, введение может быть местным (например, на кожу), внутривожным, подкожным, внутримышечным, внутри-

венным, оральным, представлять собой инъекцию склеры и т.д.

При некоторых заболеваниях слизистый слой проявляет повышенную толщину, что приводит к уменьшению абсорбции лекарств через легкие. Одним из таких заболеваний является хронический бронхит, другим примером является муковисцидоз. Существуют различные формы нормализаторов слизи, такие как ДНКазы, гипертонический солевой раствор или маннит, который коммерчески доступен под названием бронхитол. Когда нормализаторы слизи используются в сочетании с редактирующими РНК олигонуклеотидными конструкциями, такими как олигонуклеотидные конструкции согласно настоящему изобретению, они могут повысить эффективность этих лекарственных средств. Соответственно, введение олигонуклеотидной конструкции в соответствии с настоящим изобретением субъекту, предпочтительно человеку, предпочтительно объединяют с нормализаторами слизи, предпочтительно с описанными в настоящем документе нормализаторами слизи. Кроме того, введение олигонуклеотидных конструкций в соответствии с настоящим изобретением может быть объединено с введением небольшой молекулы для лечения CF, такой как потенцирующие соединения, например, калидеко (ивакафтор, VX-770) или корректорные соединения, например, VX-809 (лумакафтор) и/или VX 661. Другие комбинированные терапии в CF могут предусматривать использование олигонуклеотидной конструкции в соответствии с настоящим изобретением в сочетании с индуктором аденозиндезаминазы с использованием IFN-гамма или TNF-альфа.

Альтернативно, или в комбинации с нормализаторами слизи, доставка в проникающие в слизь частицы или наночастицы может быть применена для эффективной доставки редактирующих РНК молекул к эпителиальным клеткам, например, легких и кишечника. Соответственно, введение олигонуклеотидной конструкции в соответствии с настоящим изобретением субъекту, предпочтительно человеку, предпочтительно использует доставку в проникающие в слизь частицы или наночастицы.

Хронические и острые инфекции легких часто присутствуют у пациентов с такими заболеваниями, как муковисцидоз. Лечение антибиотиками снижает бактериальные инфекции и такие симптомы, как сгущение слизи и/или образование биопленки. Использование антибиотиков в сочетании с олигонуклеотидными конструкциями согласно настоящему изобретению может повысить эффективность редактирования РНК из-за более легкого доступа целевых клеток к олигонуклеотидной конструкции. Соответственно, введение олигонуклеотидной конструкции в соответствии с настоящим изобретением субъекту, предпочтительно человеку, предпочтительно объединяют с терапией антибиотиками для снижения бактериальных инфекций и таких симптомов, как сгущение слизи и/или образование биопленки. Антибиотики можно вводить системно или локально или и так, и так.

Для применения, например, для пациентов с муковисцидозом, олигонуклеотидные конструкции согласно настоящему изобретению или упакованные или связанные в комплекс олигонуклеотидные конструкции в соответствии с настоящим изобретением могут быть объединены с любым нормализатором слизи, таким как ДНКаза, маннит, гипертонический физиологический раствор и/или антибиотики и/или малая молекула для лечения CF, такая как соединения потенцирующего вещества, например, ивакафтор, или корректорные соединения, например, лумакафтор и/или VX-661. Чтобы увеличить доступ к целевым клеткам, может применяться бронхоальвеолярный лаваж (BAL) для очистки легких перед введением олигонуклеотида в соответствии с настоящим изобретением.

### Примеры

Пример 1. Редактирование нонсенс-мутации в целевой РНК GFP с использованием различных антисмысловых олигонуклеотидов и анализа последовательности.

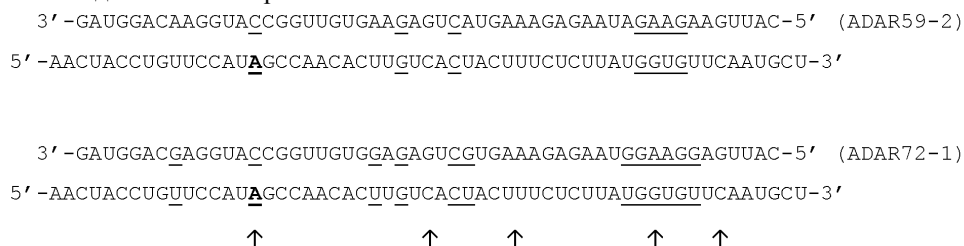
Редактирование РНК впервые исследовали в клеточной системе с использованием клеток HeLa, которая содержит экспрессионную конструкцию, кодирующую зеленый флуоресцентный белок (GFP), стабильно интегрированный в клеточный геном. В этой конструкции стоп-кодон (TAG) был введен в положение кодонов 57, что приводит к триплетному UAG в мРНК. Редактирование РНК в аденозине в центре этого триплета в конечном итоге приведет к экспрессии нормального полноразмерного белка. Конструкцию (см. ниже) и клеточную линию получали с использованием способов, известных специалисту в настоящей области техники.

Исследовали, можно ли А в центре этого триплета фактически дезаминировать до I (который впоследствии будет считываться как G), используя набор различных антисмысловых олигонуклеотидов, содержащих различные несоответствия по сравнению с целевой РНК; см. фиг. 1. Редактирование триплета UAG приведет к UGG, представляющему собой кодон для Trp, а затем функциональному белку GFP. Чтобы гарантировать, что никакие другие аденозины в целевой РНК не будут редактироваться, только три нуклеотида в антисмысловом олигонуклеотиде, противоположном стоп-кодону (3'-ACC-5' в каждом из олигонуклеотидов с несоответствием С в центре; см. фиг. 1) не содержали 2'-ОМе-группу, тогда как все остальные нуклеотиды в антисмысловом олигонуклеотиде содержали. Кроме того, терминальные четыре связи на каждой стороне всех исследуемых олигонуклеотидов представляют собой фосфоротионатные связи, тогда как остальные связи представляют собой нормальные фосфодиэфирные связи.

В качестве первой стадии исследовали, выявит ли анализ последовательности то, что нуклеотид в этом положении действительно может быть отредактирован комбинацией любого из олигонуклеотидов по настоящему изобретению и ADAR2. Для этого  $0,4 \times 10^6$  клеток HeLa, стабильно экспрессирующих кон-

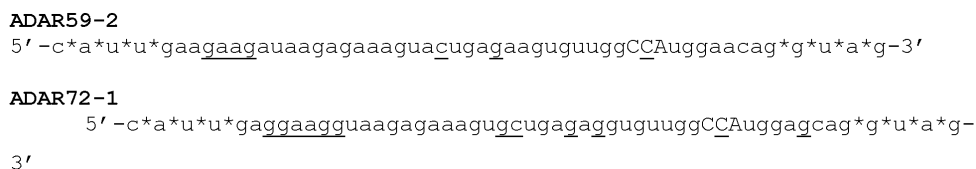
струкцию GFPstop57, высевали в лунку (6-луночные планшеты) в модифицированной Дульбекко среде Игла с 10% фетальной бычьей сывороткой. Через 24 ч клетки для последующих трансфекций AON трансфицировали с 2 мкг сверхэкспрессирующей ADAR2 плазмиды (RC212324, Origene) с использованием липофектамина 3000. Спустя 48 ч выбранные образцы клеток трансфицировали либо 0, 50, либо 100 нМ каждого AON (см. фиг. 1) с использованием липофектамина 3000. Спустя еще 24 ч РНК выделяли из лизированных клеток и использовали в качестве матрицы для синтеза кДНК. Анализ редактирования РНК проводили с помощью анализа RT-PCR (прямой праймер 5'-AGAGGGTGAAGGTGATGCAA-3' (SEQ ID NO: 7) и обратный праймер 5'-GGGCATGGCACTCTTGAAAA-3' (SEQ ID NO: 8)), за которым следовало секвенирование Сэнгера продукта ПЦР с использованием общей RT-PCR и способов секвенирования, известных специалисту в настоящей области техники. Эффективность редактирования А в I может быть проанализирована с помощью секвенирования Сэнгера продуктов RT-PCR, где редактирование А в I должно быть очевидным в хроматограмме секвенирования в виде (частичного) сдвига в интенсивности сигнала от А к G. Хотя способ не является полностью количественным, отношение частот А и G можно использовать в качестве приблизительной оценки эффективности редактирования А в I. Как и ожидалось, никакого сигнала для G не наблюдается, перекрывая пик А в целевом сайте в образцах, которые не были трансфицированы ни одним AON (фиг. 2, панели А и В). Напротив, в образцах, трансфицированных AON, в этом положении наблюдается частичное изменение в G, о чем свидетельствуют перекрывающиеся пики А и G (зеленый и черный на фиг. 2 соответственно). Эффект варьирует: в то время как небольшое количество перекрывающегося G-сигнала в целевом сайте может наблюдаться с каждым AON, эффект сильнее всего с такими AON, как ADAR58 и ADAR59 (фиг. 2G-2J).

Неоднозначные пары оснований играют фундаментальную роль во вторичной структуре РНК и присутствуют в тРНК в большой степени. Очень часто их присутствие в последовательности РНК близко к выпуклым структурам РНК, петлям и несоответствиям. Чтобы исследовать влияние наличия неоднозначных пар оснований в области AON на редактирование РНК, изобретатели настоящего изобретения разработали ADAR72-1, содержащий пять неоднозначных пар оснований. Исследовали его способность индуцировать редактирование нонсенс-мутации в целевой РНК GFP (см. выше) и сопоставили с олигонуклеотидом ADAR59-2 (=ADAR59; см. выше), который характеризуется точно такой же последовательностью, но без неоднозначных пар оснований:



Верхняя нить представляет собой AON, тогда как нижняя нить представляет собой целевую РНК от 5' к 3'. Целевой аденозин выделен жирным шрифтом. Несовпадения и неоднозначные соответствия подчеркнуты, а стрелки показывают положения дополнительных неоднозначных пар оснований.

ADAR59-2 (=ADAR59, SEQ ID NO: 4; см. также пример 5) и ADAR72-1 (SEQ ID NO: 34) химически модифицированы, как показано ниже: регистр строчных букв представляет 2'-О-метилированные модифицированные нуклеотиды РНК, тогда как нуклеотиды регистра прописных букв представляют собой немодифицированные нуклеотиды РНК. Звездочки представляют собой межнуклеозидные фосфоротионатные связи на 3'- и 5'-концах AON. Несовпадения и неоднозначные соответствия обозначены подчеркиванием.



Как ADAR59-2, так и ADAR72-1 исследовали в анализе редактирования *in vitro* с использованием лизатов клеток HEK293 со сверхэкспрессированной изоформой 2 ADAR2 (ADAR2a). В качестве отрицательных контролей использовали лизат клеток HEK293 со сверхэкспрессированным ADAR2a, но без AON. Для получения лизатов клетки HEK293 сначала трансфицировали в течение ночи экспрессирующей ADARB1 плазмидой (OriGene) в количестве 500 нг с использованием липофектамина 3000. Затем клетки лизировали с использованием реагента Lysis-M. 200 нМ AON и 90 мМ матрицы ssRNA предварительно инкубировали вместе в буфере для редактирования *in vitro* в течение 30 мин при 30°C. После предварительной инкубации добавляли клеточные лизаты (10 мкл) и реакционную смесь инкубировали в течение 30 мин при 30°C и затем в течение 30 мин при 37°C. Затем целевые РНК экстрагировали фенольно-хлороформной экстракцией и обратно транскрибировали с использованием реагентов Maxima RT, используя протокол изготовителя, и секвенирование готовили, как описано выше. Данные секвени-

рования, представленные на фиг. 3, не показывают обнаруживаемого редактирования А в I для образца, где не использовался AON: не было видно сигнала G выше фона. Напротив, имеется явное присутствие сигнала G, видимого для образца, где в анализе редактирования использовали олигонуклеотид ADAR59-2. Кроме того, для олигонуклеотида ADAR72-1 показана еще более высокая интенсивность сигнала G, что указывает на то, что наличие дополнительных неоднозначных пар оснований в целевой последовательности РНК/AON помогает увеличить редактирование А в I.

Пример 2. Редактирование РНК при лечении синдрома Гурлера.

Одно потенциальное целевое заболевание для редактирования РНК с использованием системы по настоящему изобретению представляет собой мукополисахаридоз типа I-Гурлера (MPS I-H, синдром Гурлера). Это заболевание вызвано мутацией с.1205G>A (W402X) в гене IDUA, который кодирует лизосомальный фермент  $\alpha$ -L-идуронидазу. Редактирование А в I с использованием способов и средств согласно настоящему изобретению потенциально может обратить мутацию в последовательность дикого типа. Синдром Гурлера представляет собой лизосомальную болезнь накопления, которая вызывает множественную органную недостаточность из-за накопления гликозаминогликанов. Существует мышиная модель с аналогичной мутацией (W392X) с мутацией в эндогенном гене. Первоначальные эксперименты проводят на этой мышиной модели, оценивая эффект в разных тканях и органах. Кроме того, оценивают содержание гликозаминогликанов в разных тканях для оценки терапевтического потенциала подхода к редактированию.

Часть последовательности экзона 9 гена Idua мыши выглядит следующим образом (мутация выделена жирным шрифтом):

5' - ATGGAGAACAACCTCT**AGGCAGAGGTCTCAAAGGCTGGGGCTGTGTTGGACAGCAATCATACAGTGGGT**-3'

Эта последовательность ДНК представляет собой SEQ ID NO: 11, соответствующая последовательность РНК представляет собой SEQ ID NO: 12.

Авторы настоящего изобретения получили ряд антисмысловых олигонуклеотидов, направленных на пре-мРНК, поступающую из этой части последовательности Idua, которые используются в редактировании РНК, как описано в настоящем документе, с использованием мышиной модели, со следующими последовательностями (верхняя нить представляет собой олигонуклеотид от 3' к 5', нижняя нить представляет собой целевую РНК от 5' к 3' (SEQ ID NO: 12), несоответствия и неоднозначные соответствия подчеркнуты):

3' - CCUCUUGUUGAGAGCCCGUCUCCAGAGUUCCGACCCCGACACAACCCUGUC-5' (ADAR65)

5' - AUGGAGAACAACUCU**AGGCAGAGGUCUCAAAGGCUGGGGCUGUGUUGGACAGCAAUCAUACAGUGGGU**-3'

3' - CCUCUUGUUGAGAGCCCGUCUCCAGAGUUCCGACCCCGACACAACCCUGUC-5' (ADAR65-2)

5' - AUGGAGAACAACUCU**AGGCAGAGGUCUCAAAGGCUGGGGCUGUGUUGGACAGCAAUCAUACAGUGGGU**-3'

3' - CCUCUUGUUGAGAGCCUGUCUCCAGAGUUCCGACCCCGACACAACCCUGUC-5' (ADAR65-2x)

5' - AUGGAGAACAACUCU**AGGCAGAGGUCUCAAAGGCUGGGGCUGUGUUGGACAGCAAUCAUACAGUGGGU**-3'

3' - UUGUUGAGAGCCCGUCUCCAGAGUUCCGACCCCGACACAACCCUGUC-5' (ADAR66)

5' - AUGGAGAACAACUCU**AGGCAGAGGUCUCAAAGGCUGGGGCUGUGUUGGACAGCAAUCAUACAGUGGGU**-3'

3' - CCUCUUGUUGAGAGCCCGUCUCCAGAGUUCAGACCCCGACAACCCUGUC-5' (ADAR67)

5' - AUGGAGAACAACUCU**AGGCAGAGGUCUCAAAGGCUGGGGCUGUGUUGGACAGCAAUCAUACAGUGGGU**-3'

3' - CCUCUUGUUGAGAGCCCGUCUCCAGAGUUCAGACCUCGACAACUCCUGUCGUUA 5' (ADAR91)

5' - AUGGAGAACAACUCU**AGGCAGAGGUCUAAAAGGCUGGGGCUGUGUUGGACAGCAAUCAUACAGUGGGU**-3'

3' - CCUCUUGUUGAGAGCCCGUCUCCAGAGUUCCGACCUCGACACA-5' (ADAR93)

5' - AUGGAGAACAACUCU**AGGCAGAGGUCUCAAAGGCUGGGGCUGUGUUGGACAGCAAUCAUACAGUGGGU**-3'

ADAR65 (SEQ ID NO:13), ADAR65-2 (SEQ ID NO:24), ADAR65-2x (SEQ ID NO:25), ADAR66 (SEQ ID NO:14), ADAR67 (SEQ ID NO:15), ADAR91 (SEQ ID NO:26) и ADAR93 (SEQ ID NO:27) содержат ряд химических модификаций, указанных ниже:



ADAR65: 5'-c\*u\*g\*u\*ccaacacagccccagccuuugagaccucugcCCAgaguuguu\*c\*u\*c\*c-3'  
 ADAR65-2: 5'-c\*u\*g\*u\*ccaacacagccccagccuuugagaccucugcCCAgaguuguu\*c\*u\*c\*c-3'  
 ADAR65-2x: 5'-c\*u\*g\*u\*ccaacacagccccagccuuugagaccucugcCCAgaguuguu\*c\*u\*c\*c-3'  
 ADAR66: 5'-c\*u\*g\*u\*ccaacacagccccagccuuugagaccucugcCCAgagu\*u\*g\*u\*u-3'  
 ADAR67: 5'-c\*u\*g\*u\*cccaaacagccccagacuuagagaccucugcCCAgaguuguu\*c\*u\*c\*c-3'  
 ADAR91: 5'-a\*u\*u\*g\*cuguccucaacagcccagcuagagaccucugcCCAgaguuguu\*c\*u\*c\*c-3'  
 ADAR93: 5'-a\*c\*a\*c\*agcccagccuuugagaccucugcCCAgaguuguu\*c\*u\*c\*c-3'

Буквы регистра строчных букв представляют собой 2'-О-метил-модифицированные нуклеотиды РНК, нуклеотиды регистра прописных букв представляют собой немодифицированные нуклеотиды РНК (следовательно, не содержат 2'-О-метил-модификацию) и окружают центральный цитидин, который находится напротив целевого аденозина, за исключением ADAR65-2, который содержит 2'-О-метил-модификацию на всех своих нуклеотидах. Звездочки обозначают (4) фосфоротиоатные связи на всех концах олигонуклеотидов. Несоответствия и неоднозначные соответствия обозначены подчеркиванием. ADAR91 содержит 5 (областей) несоответствий/неоднозначных соответствий с целевой РНК, ADAR67 содержит 4, ADAR93 и ADAR65-2X оба содержат 2, тогда как AON ADAR65, ADAR65-2 и ADAR66 различаются только нуклеотидом, противоположным целевому аденозину. ADAR65 и ADAR66 идентичны по модификациям, но длина ADAR66 на 2 нуклеотида короче, чем ADAR65 на 3'-конце.

Влияние этих AON на восстановление последовательности дикого типа исследовали в анализе, который измеряет активность фермента  $\alpha$ -L-идуронидазы, кодируемого Idua. Для этого иммортализованные эмбриональные клетки фибробластов (70000 на образец) и трансфицировали с 1 мкг плазмиды, экспрессирующей мРНК W392X Idua с использованием липофектамина 3000. Через 24 ч клетки аналогичным образом трансфицировали с 100 нМ (конечная концентрация) олигонуклеотида и культивировали в течение дополнительных 48 ч. Затем клетки собирали и лизировали в буфере mPER (Thermo Scientific #78501). Клеточные фрагменты удаляли из лизатов путем центрифугирования и для ферментативного анализа использовали 25 мкл супернатанта: 25 из 360 мкл 4-метилумбеллиферил- $\alpha$ -L-ифурида в 0,4 М буфере формиата натрия (рН 3,5) добавляли в образцы лизата, которые затем инкубировали в течение 2 ч при температуре 37°C. Реакцию прерывали добавлением 200 мкл 0,17 М глицинового буфера (рН 9,9) и затем измеряли полученную флуоресцентную интенсивность (длина волны возбуждения 365 нм и излучение 450 нм). Результаты нормировали к общей концентрации белка в образцах, как измерено с помощью анализа BCA (Pierce™ BCA Protein Assay Kit, Thermo Scientific).

Результаты (см. фиг. 4) ясно показывают, что в этих условиях трансфекции с олигонуклеотидами ADAR65-2 и ADAR 93-1 приводили к лишь небольшим улучшениям в ферментативной активности (менее чем в 2 раза) по сравнению с флуоресценцией, полученной с образцами из обработанных неолigonуклеотидом клеток (NT), которые экспрессируют только мРНК мутантного Idua. Напротив, с другими AON наблюдались значительные увеличения, при этом AON ADAR67 и ADAR91 приводили к увеличению активности более чем в 2 раза, а AON ADAR66, ADAR65 и ADAR65-2X приводили к увеличению более чем в 3,4 и 6 раз соответственно.

Впоследствии, основываясь на данных моделирования взаимодействия между олигонуклеотидом, целевой РНК и белком ADAR, изобретатели предположили, что несоответствие олигонуклеотида с положением 4 выше по ходу транскрипции от сайта редактирования может усилить связывание белков ADAR с целевой РНК и тем самым увеличить эффективность редактирования и уровни редактирования. Разработали четыре олигонуклеотида (ADAR93-2, ADAR93-3, ADAR93-4 и ADAR93-5) для исследования влияния несоответствия в положении 4 на редактирование целевой мРНК мышинового мутантного гена Idua (W392X) и восстановление его последовательности WT.

3' CCUCUUGUUGAGACCCGUCUCCAGAGUUUCCGACCUCGACACA 5' (ADAR93-2)  
 5' UGUUGGAUGGAGAAACAACUCUAGGCAGAGGUCUCAAGGCUGGGGCUGUGUUGGACAGCAA 3'

3' CCUCUUGUUAAGACCCGUCUCCAGAGUUUCCGACCUCGACACA 5' (ADAR93-3)  
 5' UGUUGGAUGGAGAAACAACUCUAGGCAGAGGUCUCAAGGCUGGGGCUGUGUUGGACAGCAA 3'

3' CCUCUUGUUGAGACCCGUCUCCAGAGUAUCCGACCUCUACACA 5' (ADAR93-4)  
 5' UGUUGGAUGGAGAAACAACUCUAGGCAGAGGUCUCAAAGGCUGGGGCUGUGUUGGACAGCAA 3'

3' CCUCUUGUUAAGACCCGUCUCCAGAGUAUCCGACCUCUACACA 5' (ADAR93-5)  
 5' UGUUGGAUGGAGAAACAACUCUAGGCAGAGGUCUCAAAGGCUGGGGCUGUGUUGGACAGCAA 3'

Верхние нити представляют собой олигонуклеотиды, нижняя нить представляет собой целевую РНК с мутацией (A), выделенной жирным шрифтом. Несоответствия и неоднозначные соответствия под-

черкнуты. Несоответствие между олигонуклеотидом ADAR93-3 и ADAR93-5 с целевой последовательностью в положении, которое расположено в 4 нуклеотидах выше против хода транскрипции от мутации в целевой последовательности, обозначено стрелкой. ADAR92-2 (помимо этого несоответствия) идентична ADAR93-3. ADAR93-4 (помимо этого несоответствия) идентична ADAR93-5. ADAR93-2 (SEQ ID NO: 28), ADAR93-3 (SEQ ID NO: 29), ADAR93-4 (SEQ ID NO: 30) и ADAR93-5 (SEQ ID NO: 31) содержат ряд химических модификаций, представленных ниже:

**ADAR93-2**

5'-a\*c\*a\*c\*a\*G\*cuc\*c\*a\*g\*c\*c\*u\*u\*G\*A\*gaccu\*c\*u\*g\*cCAGaguu\*g\*u\*u\*c\*u\*c\*c-3'

**ADAR93-3**

5'-a\*c\*a\*c\*a\*G\*cuc\*c\*a\*g\*c\*c\*u\*u\*G\*A\*gaccu\*c\*u\*g\*cCAGauu\*g\*u\*u\*c\*u\*c\*c-3'

**ADAR93-4**

5'-a\*c\*a\*c\*a\*U\*cuc\*c\*a\*g\*c\*c\*u\*a\*G\*A\*gaccu\*c\*u\*g\*cCAGaguu\*g\*u\*u\*c\*u\*c\*c-3'

**ADAR93-5**

5'-a\*c\*a\*c\*a\*U\*cuc\*c\*a\*g\*c\*c\*u\*a\*G\*A\*gaccu\*c\*u\*g\*cCAGauu\*g\*u\*u\*c\*u\*c\*c-3'

Буквы регистра строчных букв представляют собой 2'-О-метил-модифицированные РНК-нуклеотиды, нуклеотиды регистра прописных букв представляют собой немодифицированные нуклеотиды РНК (следовательно, с отсутствием модификации 2'-О-метила). Звездочки между нуклеозидами изображают фосфориотатные связи. Несоответствия и неоднозначные соответствия обозначены подчеркиванием.

Влияние этих четырех олигонуклеотидов на восстановление последовательности дикого типа исследовали в редактировании и ферментативном анализе, как описано выше. Как показано на фиг. 5А и 5В, введение несоответствия С-А олигонуклеотида ADAR93-2 и ADAR93-5 с целевой последовательностью оказало положительное влияние на редактирование, что показано посредством увеличения флуоресцентного сигнала по сравнению с олигонуклеотидами без несоответствия (ADAR93-2 и ADAR93-4 соответственно). Это указывает на то, что дополнительное несоответствие с положением в 4 нуклеотидах выше против хода транскрипции от сайта редактирования (выше против хода транскрипции соответствует направлению к 5' в целевой последовательности) может помочь белкам ADAR дополнительно связываться с целевой РНК, что затем приводит к повышению эффективности редактирования.

Пример 3. Редактирование РНК при лечении дефицита АААТ.

Другим целевым заболеванием для редактирования РНК с использованием подхода, описанного в настоящем документе, является дефицит А1АТ (А1АТД), вызванный мутацией с.1096G>А в гене SERPINA1. Мишенью является мутантная последовательность с. 1096G>А человека как для доставки *in vitro*, так и для *in vivo*. Мышиные модели содержат гуманизованную последовательность. Для доставки *in vivo* основной целью конструкций, которые разработаны в соответствии с настоящим изобретением, является печень, так как именно здесь вырабатывается большая часть А1АТ. Оценка основана на наблюдаемой активности редактирования на уровне РНК, а также на функциональном восстановлении фенотипов легких и печени, связанных с этим заболеванием.

Пример 4. Редактирование РНК при лечении болезни Паркинсона.

Еще одним целевым заболеванием для редактирования РНК с использованием подхода по настоящему изобретению является болезнь Паркинсона, вызванная мутацией с.6055G>А в гене LRRK2. Это самая распространенная генетическая причина, связанная с болезнью Паркинсона. Исследуют различные способы направленного воздействия антисмысловыми олигонуклеотидами на клетки головного мозга, разработанными, как представлено в настоящем документе, начиная с прямых инъекций с использованием мышиной модели. Оценка эффективности в основном основана на активности редактирования, наблюдаемой на уровне РНК. Также изучают фосфопротеому клеток, чтобы установить, что активность гиперактивной киназы (которая, как известно, влияет, например, на ГТФазы Rab), вызванная мутацией, отменяется. В конечном счете, оценивается влияние на целостность nigrostriарных дофаминергических нейронов мышей.

Пример 5. Редактирование РНК эндогенным ADAR.

Чтобы исследовать, может ли быть выполнено редактирование РНК без сверхэкспрессии экзогенных ферментов ADAR, сначала оценивали, какие доступные клеточные линии экспрессируют ADAR1 и/или ADAR2. Эти клетки (если (сверх)экспрессирующие ADAR1 и/или ADAR2) затем трансфицировали конструкцией, содержащей стоп-кодон GFP, как описано в примере 1, вместе с представляющими интерес олигонуклеотидами для редактирования остановки GFP. Следующие линии клеток первоначально исследовали в отношении экспрессии ADAR: A549 (карцинома легкого человека), HCT116 (карцинома толстого кишечника человека), T84 (карцинома толстого кишечника человека), SNU-449 (гепатоцеллюлярная карцинома человека), SNU-475 (гепатоцеллюлярная карцинома человека) PANC1 (рак поджелудочной железы человека), SK-N-SH (нейробластома человека) и MCF7 (карцинома молочной железы человека). Клетки A549 хранили в RPMI1640+10% FBS, HCT116 (ATCC #62765668) хранили в 5A+10% FBS McCoу, T84 хранили в DMEM: F12 (1:1)+10% FBS, SNU-449 (ATCC #63014146) хранили в

RPMI1640+10% FBS, SNU-475 (ATCC #62996846) хранили в RPMI1640+10% FBS, PANC1 хранили в DMEM+10% FBS, SK-N-SH хранили в MEME+10% FBS+5 мл/л NaPyr+5 мл/л глутамакс и клетки MCF7 хранили в DMEM+10% FBS. Экспрессию ADAR1 и ADAR2 в каждой клеточной линии проверяли с помощью вестерн-блоттинга. Для этого клетки собирали, а количественную оценку белка проводили с использованием набора для анализа белков BSA Pierce (Thermo Scientific) с использованием протокола изготовителя. Равные количества белка разделяли на геле ДСН-ПААГ и переносили в мембраны для анализа. Первоначально блоты окрашивали Ponceau S для визуализации полной загрузки белка, которая оказалась равной для всех линий/полос клеток (данные не показаны). Затем мембраны промывали 1 раз в PBS-T, инкубировали в 10 мл первичных мышинных антител к ADARB1 (SAB1405426 (Sigma), 1:1000 в 0,05% PBS-T) и мышинном антителе к ADAR1 (GT1066 ab 184527 (Abcam) 1:1000, в 0,05% PBS-T) и растворе антитела к тубулину кроликов (1:5000 в 0,05% PBS-T) на испытательном стенде O/N при 4°C. На следующий день мембраны промывали 3×5 мин PBS-T и инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре с 1:5000 антимишиным IRDye 800CW и 1:5000 антикроличьим IRDye 680RD. Мембраны промывали 3×5 мин PBS-T и затем 5 мин с PBS. Мембраны сканировали с использованием системы обработки изображений Odyssey CLx (LiCor Bioscience) с параметрами длины волны 700 и 800 и автоматической настройкой изображения.

Вестерн-блоты показаны на фиг. 6. В то время как загрузка белка была эквивалентна для всех клеточных линий, что может быть выведено из экспрессии В-тубулина, представляется, что экспрессия ADAR1 схожа для всех клеточных линий, за исключением клеточной линии рака молочной железы человека MCF7, в которой экспрессия значительно ниже. С другой стороны, экспрессия ADAR2 схожа для всех клеточных линий, за исключением гепатоцеллюлярной карциномы SNU-475 человека, где она, по-видимому, присутствует, но значительно менее распространена. Остальные 6 клеточных линий, по-видимому, экспрессируют ADAR1 и ADAR2 до сопоставимых уровней.

Так как все клеточные линии экспрессировали ADAR1 или ADAR2 или и ADAR1, и ADAR2, все клетки, кроме T84, которые оказалось трудно трансфицировать, исследовали, чтобы проверить, достаточно ли этого эндогенного содержания редактирующих РНК ферментов для редактирования РНК в заданном положении в целевой последовательности.

Для этого клетки трансфицировали целевой последовательностью (GFPstop57) и олигонуклеотидами. Экспрессионная конструкция GFPstop57 (фиг. 10A) представляет собой ту же конструкцию, что и при получении линии клеток HeLa (пример 1) со стабильно интегрированной последовательностью GFPstop57 (SEQ ID NO: 9; фиг. 10B), которая кодирует белок из 57 аминокислот из-за останковки в остатке 58 (SEQ ID NO: 10 для аминокислотной последовательности, фиг. 10B).

Клетки высевали в количестве приблизительно  $0,3 \times 10^6$  клеток на лунку в 6-луночной планшете в 2 мл среды. Через 24 ч после высевания клетки трансфицировали плазмидой GFPstop57 в количестве 1000 нг с использованием липофектамина 2000 (Invitrogen) и Opti-Mem (Gibco), применяя общие технологии, известные специалисту в настоящей области техники. Через 6 ч после этой трансфекции добавляли 2 мл свежей среды и через 48 ч после высевания клетки трансфицировали олигонуклеотидом в количестве 100 нМ, и снова через 6 ч добавляли 2 мл свежей среды. Клетки собирали через 30 ч после трансфекции олигонуклеотидом. Рандомизированные трансфекции олигонуклеотидом и Mock (Cy5) принимались как отрицательные контроли. Исследовали следующие антисмысловые олигонуклеотиды, аналогичные тем, что показаны в примере 1 и на фиг. 1 и SEQ ID NO: 1-4 соответственно:

ADAR56-2

5' - g\*a\*a\*a\*guagugacaaguguuuggCCAuggaacagguaguuuuc\*c\*a\*g\*u -3'

ADAR57-2

5' - g\*a\*a\*a\*guagugagaaguguuuggCCAuggaacagguaguuuuc\*c\*a\*g\*u -3'

ADAR58-2

5' - g\*a\*a\*a\*gucucgacaaguguuuggCCAuggaacagguacaauuc\*c\*a\*g\*u -3'

ADAR59-2

5' - c\*a\*u\*u\*gaagaagauaagagaagaagucagagaaguguuuggCCAuggaacag\*g\*u\*a\*g -3'

Буквы регистра строчных букв представляют собой 2'-О-метил-модифицированные РНК-нуклеотиды, нуклеотиды регистра прописных букв представляют собой немодифицированные нуклеотиды РНК (следовательно, с отсутствием модификации 2'-О-метила) и окружают центр С, который находится напротив целевого аденозина в GFPstop57. Звездочки (\*) отображают фосфоротионатные связи между нуклеозидами на концах олигонуклеотидов.

Через 36 ч после трансфекции РНК выделяли из лизированных клеток и использовали в качестве матрицы для синтеза кДНК и ПЦР. Качество РНК проверяли с помощью биоанализатора Agilent 2100. Анализ редактирования РНК проводили с помощью RT-PCR, как описано в примере 1, с последующим секвенированием Сэнгера ПЦР-продукта с использованием общей RT-ПЦР и способов секвенирования, известных специалисту в настоящей области техники. RT-PCR показала, что все 5 оставшихся клеточных линий, которые трансфицировали конструкцией GFPstop57 и олигонуклеотидами (за исключением клеток SK-N-SH, которые трансфицировали ADAR59-2), дали продукт с нуклеотидом 175 (данные не пока-

заны). Продукт ПЦР из разных клеточных линий использовали в анализе последовательностей с использованием праймера GFP forward3 (SEQ ID NO: 7; см. выше) и GFP reverse3 (SEQ ID NO: 8; см. выше). В клетках A549, HCT116 и PANC1 никакого существенного сдвига от TAG→TGG (прямое направление) или от CTA→CCA (обратное направление) не могло быть обнаружено выше фоновых уровней, тогда как в клетках SNU-449 наблюдался некоторый сдвиг с олигонуклеотидами ADAR56-2 и ADAR59-2 (данные не показаны). Самые ясные результаты, которые были намного выше, получили с клетками SNU-475 и MCF7. На фиг. 7 показаны результаты с четырьмя олигонуклеотидами на клетках SNU-475 (рак печени) с использованием прямого (FWD) и обратного (REV) праймеров в секвенировании. На фиг. 8 показаны результаты с четырьмя олигонуклеотидами на клетках MCF7 (рак молочной железы) с использованием прямого (FWD) праймера в секвенировании. Эти фигуры показывают очень четкий и значительный сдвиг в последовательности в целевом положении, при этом, похоже, что ADAR59-2 обеспечивал наилучшие результаты в MCF7, тогда как редактирование РНК с эндогенным ADAR наблюдалось в клетках SNU-475 с использованием всех четырех олигонуклеотидов. На фиг. 9 представлены результаты секвенирования после использования ADAR57-2 (см. также фиг. 7 слева внизу), указывающие, что только в целевом аденозине (стрелка) происходит дезаминирование, показывая, что не происходит неизбирательного редактирования в окружающих аденозинах, а AON и способы по настоящему изобретению обеспечивают очень сайт-специфическое редактирование. Эти результаты показывают, что авторы настоящего изобретения достигли редактирования РНК в клетках, в которые была введена целевая последовательность и редактирующий РНК олигонуклеотид (со специфическими модификациями), без необходимости сверхэкспрессии редактирующего РНК фермента, то есть, опираясь на ферментативную активность эндогенных белков ADAR и сайт-специфический способ (т.е. был отредактирован только один аденозин в последовательности РНК, нацеленный посредством AON; см. фиг. 9).

Пример 6. Редактирование РНК эндогенным ADAR на эндогенной мишени.

После достижения редактирования РНК с использованием эндогенных ферментов ADAR, как описано в примере 5, исследовали, может ли быть достигнуто редактирование РНК с использованием эндогенных ферментов ADAR без использования совместной трансфекции целевой последовательности. Авторы настоящего изобретения выбрали полипептид А малых ядерных рибонуклеопротеинов (Snrpa) в качестве эндогенной мишени из-за его относительно высокого изобилия и повсеместной экспрессии. Ген кодирует белок, который связывается со структурой петля-на-стебле II малого ядерного рибонуклеопротеина U1, который связывает 5'-сайт сплайсинга предшественников мРНК и необходим для сплайсинга. AON разрабатывали для редактирования стоп-кодона дикого типа (UAG) Snrpa мРНК мыши, который затем, вероятно, приводил бы к удлинению открытой рамки считывания и удлинению белка, кодируемого последовательностями ниже по ходу транскрипции (фиг. 11).

Сначала разработали два AON: ADAR87-1 и ADAR89-1 (см. табл. 2) и исследовали в клетках Нера 1-6, которые представляют собой клеточную линию, полученную из гепатомы мыши BW7756, которая возникла у мышей C57/L. Клетки высевали в 6-луночный планшет за 24 ч до трансфекции в количестве 200000 клеток/лунку в обычной культуральной среде (DMEM+10% FCS). Через 24 ч клетки либо не трансфицировали (контроль NT и только AON), либо трансфицировали плазмидой в количестве 1000 нг, кодирующей короткую изоформу ADAR2 (ADAR2sh) с использованием липофектамина 2000 (Invitrogen) в соответствии с протоколами производителя. Среду меняли перед добавлением трансфекционной смеси, и среду обновляли в лунках без трансфекции. Снова через 24 ч клетки либо не трансфицировали (контроль NT), либо трансфицировали AON ADAR87-1 или ADAR89-1с конечной концентрацией 100 нМ на лунку. Среду обновляли до трансфекции.

Клетки инкубировали в течение 48 ч после второй трансфекции (или в случае только AON, после единственной трансфекции) при 37°C. Среду удаляли и клетки промывали один раз 1×PBS, и 400 мкл Trizol добавляли в каждую лунку для клеточного лизиса. Затем Trizol собирали в 1,5 мл пробирках Эппендорфа, а РНК экстрагировали с помощью miniprep Direct-Zol (Zymo) в соответствии с инструкциями производителя. Концентрации РНК измеряли с использованием Nanodrop, и 500 нг РНК использовали для синтеза кДНК с помощью набора Maxima Reverse Transcriptase (ThermoFisher Scientific). На первой стадии AON диссоциировали из целевой мРНК путем инкубации с частично комплементарным смысловым олигонуклеотидом mSnrpa-SON3 в количестве 1,2 мкл (2 мкМ):

5'-U\*C\*C\*U\*UUGCCAAGAAGUGGCACCUUUUCCUCCCAUGCCUACUCC\*U\*U\*C\*C-3'

(SEQ ID NO: 20). Звездочки в mSnrpa-SON3 указывают на межнуклеозидные фосфоротиоатные связи. Все нуклеотиды в этом олигонуклеотиде являются 2-О-метилованными. Синтез кДНК проводили с использованием протоколов изготовителя.

ПЦР проводили с использованием прямого праймера Fw1 mSNRPA 5'-GCCTTCGTGGAGTTT-GACA-3' (SEQ ID NO: 21) и обратного праймера Rev1\_mSNRPA 5'-ACACACGGCTCTGAGAAGGT-3' (SEQ ID NO: 22) с использованием способов, общеизвестных специалисту в настоящей области техники. Продукт ПЦР проверяли на биоанализаторе Agilent 2100 и очищали с помощью геля Nucleo-Spin и набора для ПЦР-очистки (Macherey-Nagel), а очищенные продукты секвенировали с секвенирующим праймером Snrp-1-Fw1 5'-CGTGGAGTTTGACAATGAAGT-3'.

Таблица 2

Название	Неизменная последовательность (от 5' к 3')	Последовательность с модификациями (от 5' к 3')
ADAR87-1 (SEQ ID NO:18)	GUAGGCAUGGGAGGAAAAG GUGCCACUUCUUGGCAAAG GA	mG*mU*mA*mG*mGmCmAmUmGmG mGmA mGmGmAmAmAmAmGmGmUmGCCA mCmU mUmCmUmUmGmGmCmA mA*mA*mG*mG*mA
ADAR89-1 (SEQ ID NO:19)	GACUGAGGUACUCCAUAGG GAAAGGUGCCACUUCUUGG CAAAGGA	mG*mA*mC*mU*mGmAmGmGmUmA mCmU mCmCmAmUmAmGmGmAmAmAm GmGmUmGCCAmCmUmUmCmUmUm GmGmCmA mA*mA*mG*mG*mA
ADAR89-2 (SEQ ID NO:32)	GACUGAGGUACUCCAUAGG GAAAGGUGCCACUUCUUGG CAAAGGA	mG*mA*mC*mU*mGmAmGmGmUmA mCmU mCmCmAmUmAmGmGmAmAmAm GmGmUmGCCAmCmUmUmCmUmUm GmGmCmA mA*mA*mG*mG*mA
ADAR94-1 (SEQ ID NO:33)	GACUGAGGUACUCCUAGA GAAAGGUGCCACUUCUUGG CAAAGGA	mG*mA*mC*mU*mGmAmGmGmUmA mCmU mCmCmUmUmAmGmAmGmAmAmAm GmGmUmGCCAmCmUmUmCmUmUm GmGmCmA mA*mA*mG*mG*mA

A, C, G и U представляют собой РНК; подчеркнутые C и A представляют собой ДНК; mA, mC, mG и mU представляют собой 2'-O-метилованные рибонуклеотиды; звездочки указывают на фосфоротионатные связи.

При использовании ADAR87-1 (данные не показаны) редактирование выше фона не наблюдалось. Результаты редактирования РНК, вызванные олигонуклеотидом ADAR89-1, представлены на фиг. 12. На панели (A) показан нетрансфицированный (NT) контроль без какого-либо обнаруживаемого редактирования РНК в положении стоп-кодона (указан стрелкой). На панели (B) показан контроль, в котором трансфицирована только плазмида, кодирующая короткую изоформу ADAR2. На панели (C) показано увеличение пика G, обозначенного стрелкой. Это увеличение, которое явно выше фона, указывает на то, что редактирование РНК (A→I) происходило в желаемом положении после трансфекции только с помощью AON ADAR89-1 в клетках, которые не были трансфицированы сверхэкспрессирующей плазмидой ADAR2. На панели (D) показан положительный контроль как с плазмидой экспрессии ADARsh, так и с AON. Считается, что этот результат (панель C) является первым среди когда-либо наблюдаемого индуцированного редактирования РНК специфически в желаемом положении путем введения антисмыслового олигонуклеотида в отсутствие сверхэкспрессии ADAR и без совместной трансфекции плазмид, которые вызывают сверхэкспрессию целевой РНК.

Были разработаны еще два олигонуклеотида: ADAR89-2 и ADAR94-1 (см. табл. 2), в которых центральный триплет CCA (средний нуклеотид C противоположен редактируемому аденозину) представляет собой ДНК, тогда как остальная часть олигонуклеотида является 2'-O-метил-модифицированной. Последовательность ADAR89-2 идентична ADAR89-1, тогда как последовательность ADAR94-1 имеет два дополнительных несоответствия по отношению к ADAR89-2 (см. фиг. 12). Эти AON исследовали в том же анализе, что и описанный в этом примере выше в клетках Нера 1-6. Полученные данные секвенирования изображены на фиг. 13, и они показывают, что для нетрансфицированного контроля (NCTRL) не обнаружено никакого редактирования РНК. Данные секвенирования для олигонуклеотида ADAR89-2 показывают наличие нуклеотида G в сайте редактирования, как указано стрелкой, что показывает, что когда центральный триплет представляет собой ДНК (а не РНК), также можно получить хорошее редактирование. Замена РНК-нуклеотидов центрального триплета, которые очень чувствительны к нуклеазам, на ДНК может добавить стабильности AON. Явное увеличение сигнала для G-пика для олигонуклеотида ADAR94-1 указывает на то, что введение двух дополнительных несоответствий в положениях 10 и 14 в последовательности ADAR89-2 оказывает еще более положительное влияние на редактирование пре-мРНК эндогенного Sngra, что снова показывает, что дополнительные выступы, несоответствия и/или неоднозначные соответствия могут еще больше повысить эффективность редактирования РНК (что во всех разных мишенях очень вероятно зависит от множества факторов, таких как последовательность, температура плавления спирали AON-РНК, перекрытие, вторичные структуры и так далее).

Пример 7. Редактирование РНК для восстановления мутации Val66Met в РНК, кодирующей BDNF.

Конструкция одноцепочечной модификации РНК, индуцирующей олигонуклеотида, может быть использована для различных целевых РНК и множества заболеваний и нарушений, связанных с такими содержащими мутацию мишенями. Одной из недавно выявленных потенциальных мишеней для болезни

Альцгеймера является полиморфизм Val66Met нейротрофического фактора головного мозга (BDNF), который также вызван мутацией G на A (Boots et al., Neurology May, 30, 2017, vol 88(22):2098-2106). Раскрытые в настоящем документе AON используют для редактирования РНК в конкретном положении мРНК BDNF. AON, которые используются для этой цели, характеризуются следующими последовательностями (с нижней нитью, представляющей собой целевую последовательность BDNF (SEQ ID NO: 35), и верхними нитями, представляющими собой олигонуклеотиды). Модификации представляют собой 2'-О-метил (регистр строчных букв), ДНК (регистр прописных букв), фосфоротиоатные связи (звездочки) и несоответствия и неоднозначные соответствия (подчеркнутые). Целевой аденозин выделен жирным шрифтом.

**BDNF AON1 (SEQ ID NO:36)**

3' -CUGUGAAAGCUUGGCAUUAUCUUCUCGACAACCUACUCCUGGUCUUUCAAG-5

5' -AUCAUUGGCGACACUUUCGAACACAUGAUAGAAGAGCUGUUGGAGAGGACCAGAAAGUUCGGCCCAAUG-3'

5' -g\*a\*a\*c\*uuucugguccucauccaaacagcucucuuuuuACGuguucgaaag\*u\*g\*u\*c-3'

**BDNF AON2 (SEQ ID NO:37)**

3' -CUGUGAAAGCUUGUICAUUAUCUUCUCGACAACCUACUCCUGGUCUUUCAAG-5

5' -AUCAUUGGCGACACUUUCGAACACAUGAUAGAAGAGCUGUUGGAGAGGACCAGAAAGUUCGGCCCAAUG-3'

5' -g\*a\*a\*c\*uuucugguccucauccaaacagcucucuuuuuACIguucgaaag\*u\*g\*u\*c-3'

**BDNF AON3 (SEQ ID NO:38)**

3' -CUGUGAAAGCUUGUGCAUUAUCUUCUCGUCAACUACUCCUGUAAUUUCAAG-5

5' -AUCAUUGGCGACACUUUCGAACACAUGAUAGAAGAGCUGUUGGAGAGGACCAGAAAGUUCGGCCCAAUG-3'

5' -g\*a\*a\*c\*uuuaauguccucauccaaacugcucucuuuuuACGuguucgaaag\*u\*g\*u\*c-3'

Понятно, что настоящее изобретение описано выше только в качестве примера, и могут быть сделаны модификации, оставаясь в пределах объема и сущности настоящего изобретения.

### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Антисмысловой олигонуклеотид (AON), способный образовывать двухцепочечный комплекс с целевой РНК в клетке, для дезаминирования целевого аденозина, присутствующего в целевой РНК, с помощью фермента аденозиндезаминазы, действующей на РНК (ADAR), присутствующей в клетке, причем

а) AON комплементарен области целевой РНК, содержащей целевой аденозин, и AON содержит одно или более несоответствий, неоднозначных соответствий и/или выпуклостей с комплементарной областью целевой РНК;

б) AON содержит один или более нуклеотидов с одной или более модификациями сахара при условии, что нуклеотид, противоположный целевому аденозину, представляет собой дезоксицитидин;

с) AON не содержит участок, который способен образовывать внутримолекулярную структуру петля-на-стебле, которая способна связывать фермент ADAR;

д) AON не содержит 5'-концевую модификацию O<sub>6</sub>-бензилгуанина;

е) AON не содержит 5'-концевую аминокислотную модификацию; а также

ф) AON не связан ковалентно с доменом SNAP-tag.

2. AON, способный образовывать двухцепочечный комплекс с целевой РНК в клетке для дезаминирования целевого аденозина, присутствующего в целевой РНК, с помощью фермента ADAR, присутствующего в клетке, причем

а) AON комплементарен области целевой РНК, содержащей целевой аденозин, и AON содержит одно или более несоответствий, неоднозначных соответствий и/или выпуклостей с комплементарной областью целевой РНК;

б) AON содержит один или более нуклеотидов с одной или более модификациями сахара при условии, что нуклеотид, противоположный целевому аденозину, представляет собой дезоксицитидин;

с) AON не содержит участок, который способен образовывать внутримолекулярную структуру петля-на-стебле, которая способна связывать фермент ADAR; а также

д) AON не является 17- или 20-мерным.

3. AON, способный образовывать двухцепочечный комплекс с целевой РНК в клетке, для дезаминирования целевого аденозина, присутствующего в целевой РНК, с помощью фермента ADAR, присутствующего в клетке, причем

а) AON комплементарен целевой области РНК, содержащей целевой аденозин, и AON содержит одно или более несоответствий, неоднозначных соответствий и/или выпуклостей с комплементарной областью целевой РНК;

б) AON содержит один или более нуклеотидов с одной или более модификациями сахара при условии, что нуклеотид, противоположный целевому аденозину, представляет собой дезоксицитидин;

с) AON не содержит участок, который способен образовывать внутримолекулярную структуру петля-на-стебле, которая способна связывать фермент ADAR; а также

д) AON длиннее 17 нуклеотидов или короче 14 нуклеотидов.

4. AON, способный образовывать двухцепочечный комплекс с целевой РНК в клетке для дезаминирования целевого аденозина, присутствующего в целевой РНК, с помощью фермента ADAR, присутствующего в клетке, причем

а) AON комплементарен области целевой РНК, содержащей целевой аденозин;

б) AON содержит один или более нуклеотидов с одной или более модификациями сахара при условии, что нуклеотид, противоположный целевому аденозину, представляет собой дезоксицитидин;

с) AON не содержит участок, который способен образовывать внутримолекулярную структуру петля-на-стебле, которая способна связывать фермент ADAR; а также

д) AON содержит 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 несоответствий, неоднозначных соответствий и/или выпуклостей с комплементарной областью целевой РНК.

5. AON по любому из пп.1-4, в котором нуклеотид, расположенный непосредственно 5' и/или 3' от нуклеотида, противоположного целевому аденозину, содержит рибозу с 2'-ОН-группой или дезоксирибозу с 2'-Н-группой.

6. AON по п.5, причем все остальные нуклеотиды в AON содержат 2'-О-алкильную группу, предпочтительно 2'-О-метильную группу.

7. AON по любому из пп.1-6, содержащий по меньшей мере одну фосфоротиоатную связь.

8. AON по п.7, в котором 2, 3, 4, 5 или 6 концевых нуклеотидов 5'- и 3'-конца AON связаны с фосфоротиоатными связями.

9. AON по п.8, в котором 5 концевых нуклеотидов на 5'- и 3'-конце связаны с фосфоротиоатными связями.

10. AON по любому из пп.1-9, причем AON длиннее, чем 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 или 17 нуклеотидов.

11. AON по любому из пп.1-10, причем AON короче, чем 100 нуклеотидов, предпочтительно короче, чем 60 нуклеотидов.

12. AON по п.10 или 11, причем AON содержит от 18 до 70 нуклеотидов, предпочтительно от 18 до 60 нуклеотидов и более предпочтительно от 18 до 50 нуклеотидов.

13. Фармацевтическая композиция, содержащая AON по любому из пп.1-12 и фармацевтически приемлемый носитель.

14. Применение AON по любому из пп.1-12 для лечения или профилактики генетического нарушения, предпочтительно выбранного из группы, состоящей из муковисцидоза, синдрома Гурлера, дефицита альфа-1-антитрипсина (A1AT), болезни Паркинсона, болезни Альцгеймера, альбинизма, бокового амиотрофического склероза, астмы,  $\beta$ -талассемии, синдрома Кадасила, болезни Шарко-Мари-Тута, хронической обструктивной болезни легких (COPD), дистальной спинальной мышечной атрофии (DSMA), мышечной дистрофии Дюшенна/Беккера, дистрофического буллезного эпидермоза, буллезного эпидермоза, болезни Фабри, связанных с фактором V Лейдена нарушений, семейного аденоматозного полипоза, галактоземии, болезни Гоше, дефицита глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, гемофилии, наследственного гемохроматоза, синдрома Хантера, болезни Хантингтона, воспалительного заболевания кишечника (IBD), наследственного синдрома полиагглютинации, врожденного амароза Лебера, синдрома Леша-Нихана, синдрома Линча, синдрома Марфана, мукополисахаридоза, мышечной дистрофии, миотонической дистрофии I и II типов, нейрофиброматоза, болезни Ниманна-Пика типа A, B и C, связанного с NY-eso1 рака, синдрома Пейтца-Егерса, фенилкетонурии, болезни Помпе, первичного цилиарного заболевания, нарушений, связанных с протромбиновой мутацией, легочной гипертензии, пигментной дистрофии сетчатки, болезни Сандхоффа, синдрома тяжелой комбинированной иммунной недостаточности (SCID), серповидно-клеточной анемии, спинальной мышечной атрофии, болезни Старгардта, болезни Тай-Сакса, синдрома Ушера, связанного с X-хромосомой иммунодефицита и рака.

15. Применение AON по любому из пп.1-12 в изготовлении лекарственного средства для лечения или профилактики генетического нарушения, предпочтительно выбранного из группы, состоящей из муковисцидоза, синдрома Гурлера, дефицита альфа-1-антитрипсина (A1AT), болезни Паркинсона, болезни Альцгеймера, альбинизма, бокового амиотрофического склероза, астмы,  $\beta$ -талассемии, синдрома Кадасила, болезни Шарко-Мари-Тута, хронической обструктивной болезни легких (COPD), дистальной спинальной мышечной атрофии (DSMA), мышечной дистрофии Дюшенна/Беккера, дистрофического бул-

лезного эпидермоза, буллезного эпидермоза, болезни Фабри, связанных с фактором V Лейдена нарушений, семейного аденоматозного полипоза, галактоземии, болезни Гоше, дефицита глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, гемофилии, наследственного гемохроматоза, синдрома Хантера, болезни Хантингтона, воспалительного заболевания кишечника (IBD), наследственного синдрома полиагглютинации, врожденного амароза Лебера, синдрома Леша-Нихана, синдрома Линча, синдрома Марфана, мукополисахаридоза, мышечной дистрофии, миотонической дистрофии I и II типов, нейрофиброматоза, болезни Ниманна-Пика типа А, В и С, связанного с NY-eso1 рака, синдрома Пейтца-Егерса, фенилкетонурии, болезни Помпе, первичного цилиарного заболевания, нарушений, связанных с протромбиновой мутацией, легочной гипертензии, пигментной дистрофии сетчатки, болезни Сандхоффа, синдрома тяжелой комбинированной иммунной недостаточности (SCID), серповидно-клеточной анемии, спинальной мышечной атрофии, болезни Старгардта, болезни Тай-Сакса, синдрома Ушера, связанного с X-хромосомой иммунодефицита и рака.

16. Способ дезаминирования по меньшей мере одного целевого аденозина, присутствующего в целевой РНК в клетке, причем способ предусматривает следующие стадии:

- (i) предоставление клетки с AON по любому из пп.1-12;
- (ii) обеспечение возможности захватывать клеткой AON;
- (iii) обеспечение возможности отжига AON с целевой РНК;
- (iv) обеспечение возможности ферменту ADAR, содержащему природный связывающий dsRNA домен, который обнаружен в ферменте дикого типа, дезаминировать целевой аденозин в целевой РНК до инозина; а также
- (v) необязательно идентификация наличия указанного инозина в целевой РНК.

17. Способ по п.16, при котором стадия (v) предусматривает

- а) секвенирование нацеленной последовательности РНК;
- б) оценку наличия функционального, удлиненного, полноразмерного белка и/или белка дикого типа, когда целевой аденозин находится в стоп-кодоне UGA или UAG, который редактируется до кодона UGG через дезаминирование;
- в) оценку наличия функционального, удлиненного, полноразмерного белка и/или белка дикого типа, когда два целевых аденозина расположены в стоп-кодоне UAA, который редактируется до кодона UGG через дезаминирование обоих целевых аденозинов;
- д) оценку того, был ли изменен сплайсинг пре-мРНК посредством дезаминирования; или
- е) использование функционального считывания, при котором целевая РНК после дезаминирования кодирует функциональный, полноразмерный, удлиненный белок и/или белок дикого типа.

18. AON по любому из пп.1-12, при котором целевая последовательность РНК кодирует CFTR, CEP290, альфа-1-антитрипсин (A1AT), LRRK2, BDNF или при котором целевая РНК транскрибируется с гена IDUA.

19. Способ по любому из пп.16, 17, при котором целевая последовательность РНК кодирует CFTR, CEP290, альфа-1-антитрипсин (A1AT), LRRK2, BDNF или при котором целевая РНК транскрибируется с гена IDUA.

**A: AON ADAR56**

3' -UGACCUUUUGAUGGACAAGGUACCGGUUGUGAACAGUGAUGAAAG-5'  
5' -CUACUGGAAAACUACCGUUCUUAAGCCAAACACUUGUCACUACUUUCUCUUAUGGUGUCAAUGCCUUU-3'

**B: AON ADAR57**

3' -UGACCUUUUGUUGGACAAGGUACCGGUUGUGAAGAGUGAUGAAG-5'  
5' -CUACUGGAAAACUACCGUUCUUAAGCCAAACACUUGUCACUACUUUCUCUUAUGGUGUCAAUGCCUUU-3'

**C: AON ADAR58**

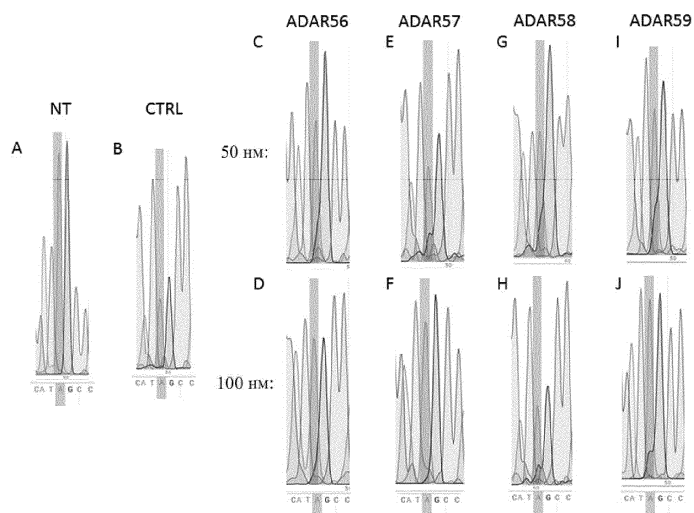
3' -UGACCUUUAACAUGGACAAGGUACCGGUUGUGAACAGUCUGAAAG-5'  
5' -CUACUGGAAAACUACCGUUCUUAAGCCAAACACUUGUCACUACUUUCUCUUAUGGUGUCAAUGCCUUU-3'

**D: AON ADAR59**

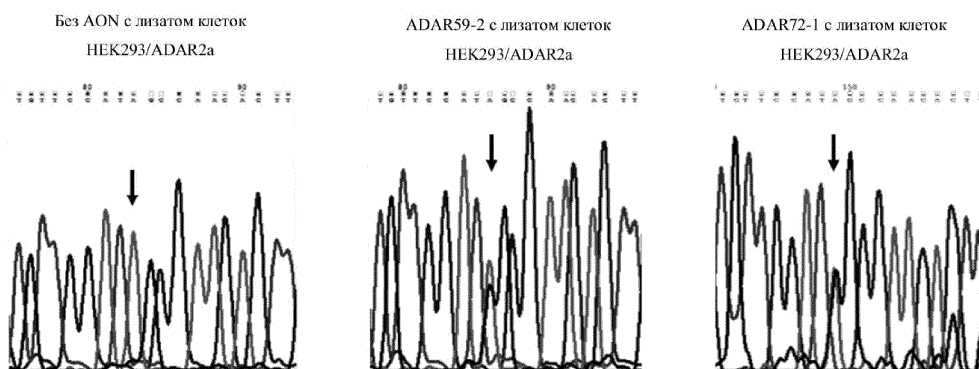
3' -GAUGGACAAGGUACCGGUUGUGAAGAGUCAUGAAAGAGAAUAGAAGAAGUUAC-5'  
5' -CUACUGGAAAACUACCGUUCUUAAGCCAAACACUUGUCACUACUUUCUCUUAUGGUGUCAAUGCCUUU-3'

Фиг. 1

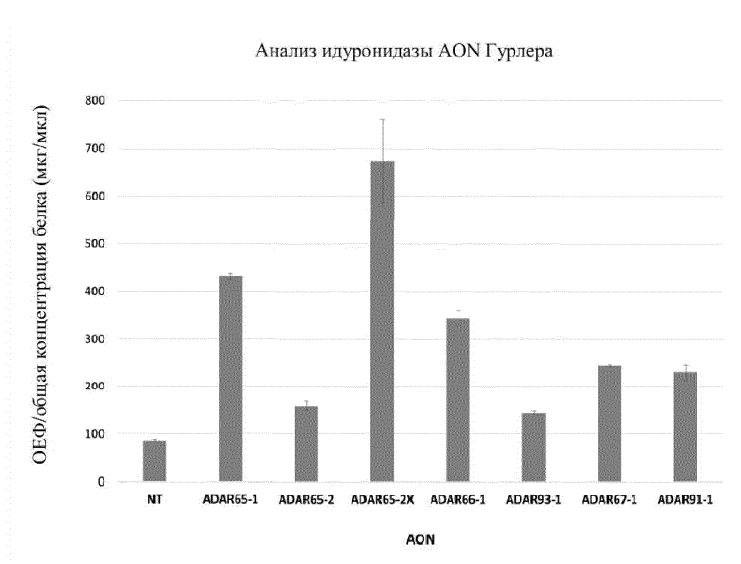




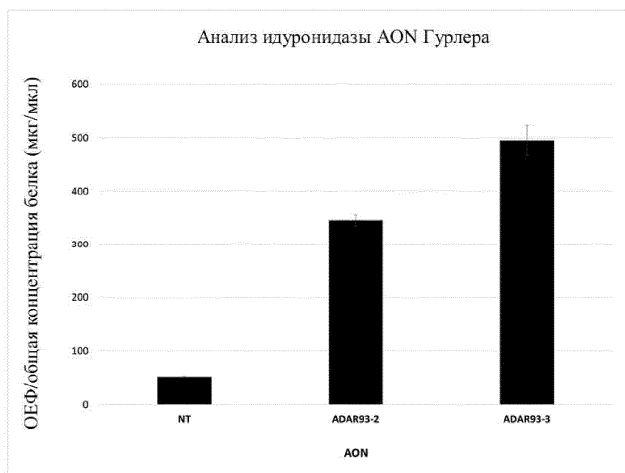
Фиг. 2



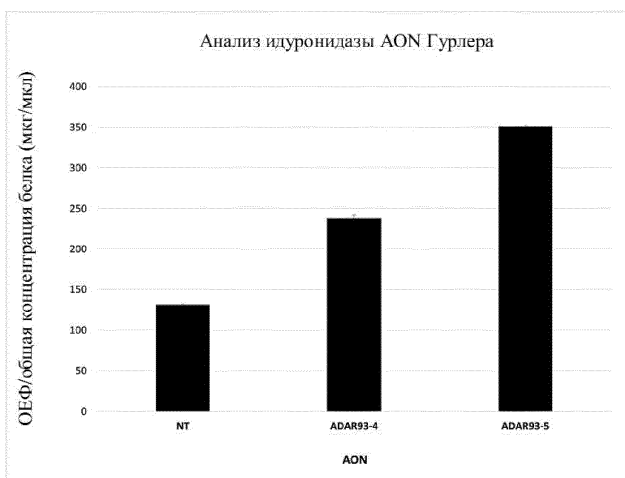
Фиг. 3



Фиг. 4

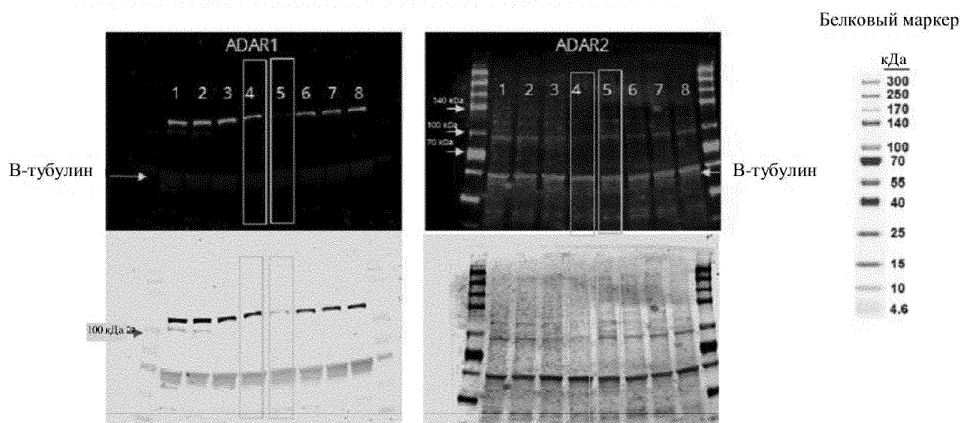


Фиг. 5А



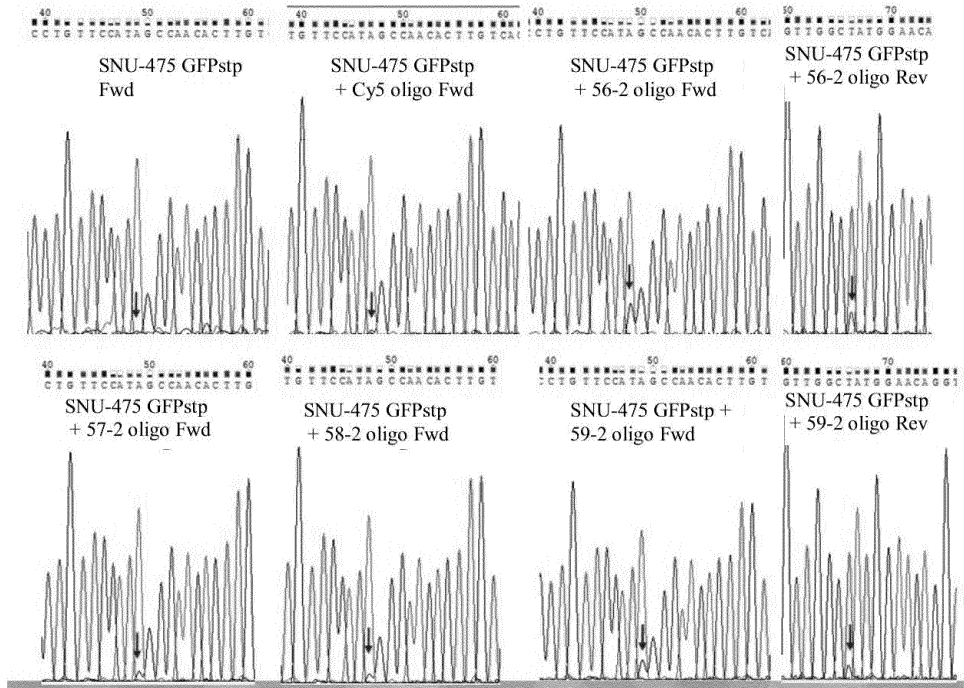
Фиг. 5В

## Экспрессия ADAR1 и ADAR2 в линиях раковых клеток

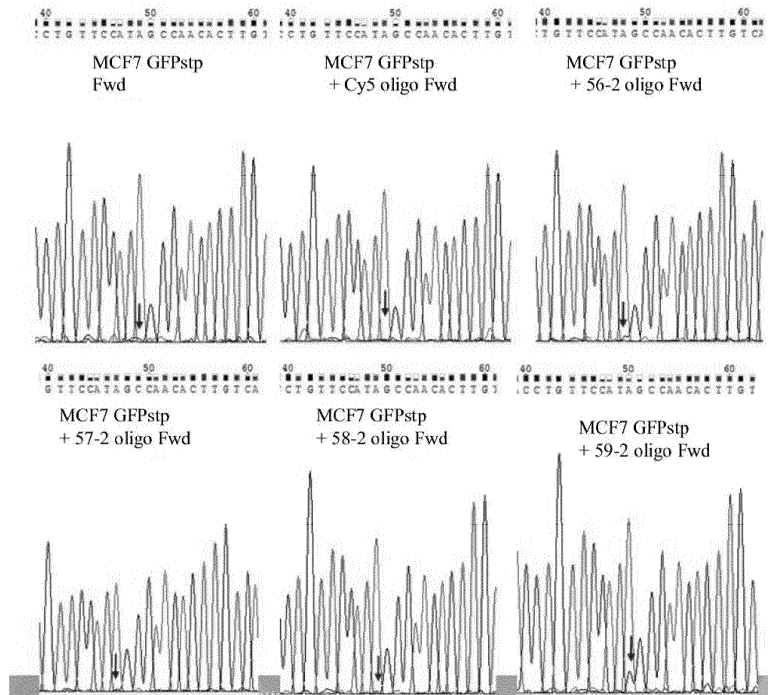


№ образца	Образцы:	Содержание образцы ткани
1	HCT116	Толстый кишечник
2	T84	Толстый кишечник
3	SNU-449	Печень
4	SNU-475	Печень
5	MCF7	Молочная железа
6	A549	Легкое
7	PANCI	Поджелудочная железа
8	SK-N-SH	Головной мозг

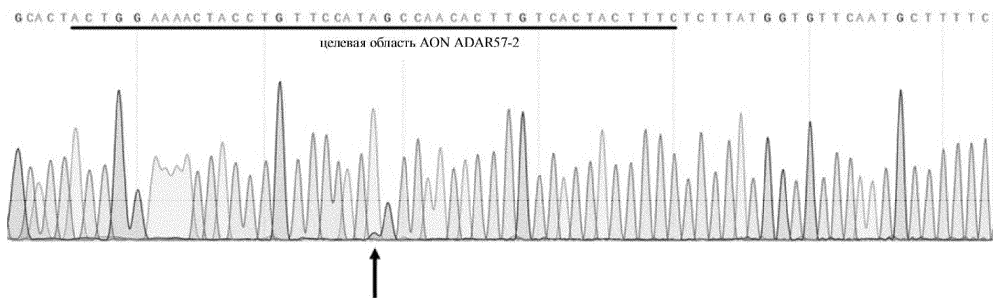
Фиг. 6



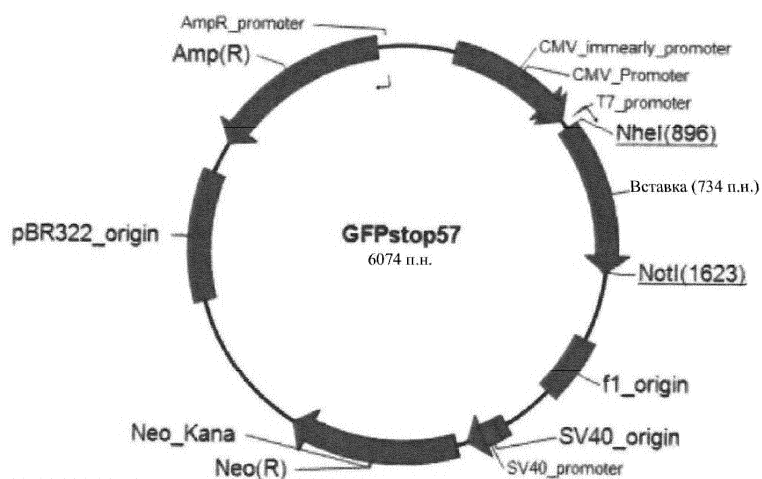
Фиг. 7



Фиг. 8



Фиг. 9



Фиг. 10А

```

      M A S K G E E L F T G V V P I L V E L D G
1.  GCTAGCATGGCCAGCAAAGGAGAAGAACTTTTCACTGGAGTTGTCCCAATTCITGTTGAATTAGATGGT
   D V N G H K F S V S G E G E G D A T Y G K L T
70.  GATGTTAATGGGCACAAATTTCTGTCAAGTGGAGAGGGTGAAGGTGATGCTACATACGGAAAGCTTACC
   L K F I C T T G K L P V P * P T L V T T F S Y
139. CTTAAATTTATTTGCACTACTGGAAAACSTACTGTTCCATAGCCAAACACTTGTCACTACTTTCTCTTAT
   G V Q C F S R Y P D H M K R H D F F K S A W P
208. GGTGTTCAATGCTTTTCCCGTATCCGGATCATATGAAACGGCATGACTTTTTCAAGAGTGCCTATGCC
   E G Y V Q E R T I S F K D D G N Y K T R A E V
277. GAAGGTTATGTACAGGAACGCACTATATCTTTCAAAGATGACGGGAACACAAGACCGTGCCTGAAGTC
   K F E G D T L V N R I E L K G I D F K E D G N
346. AAGTTTGAAGGTGATACCSTTGTAAATCGTATCGAGTTAAAAGTATTGATTTTAAAGAAGATGAAAC
   I L G H K L E Y N Y N S H N V Y I T A D K Q K
415. ATTCGGACACAAAACSTCGAATACAACTATAACTACACAATGTATACATCACGGCAGACAAAACAAAAG
   N G I K A N F K I R H N I E D G S V Q L A D H
484. AATGGAATCAAAGCTAACTTCAAATTCGCCACAACATTGAAGATGATCCGTTCAACTAGCAGACCAT
   Y Q Q N T P I G D G P V L L P D N H Y L S T Q
553. TATCAACAAAATACTCCTAAATGGCGATGGCCCTGTCTTTTACCAGACAACCATTACTGTCGACACAA
   S A L S K D P N E K R D H M V L L E F V T A A
622. TCTGCCCTTTCGAAAAGATCCCAACGAAAAGCGTGACACATGGTCCCTTCTTGAAGTTTGAATGCTGCT
   G I T H G M D E L Y K *
691. GGGATTACACATGGCATGGATGAGCTCTACAATAAGCGGCCCGC

```

Фиг. 10В

А

5'...AAGAUCUCUUUUGCCAAGAAGUAGCGCCUUUCCCUAUGGAGUACCCAGUCCCUUCCCCCCCUCUUUGGCUCAGUCCCUGAAGGUAAGUCCCCCUUAG  
K I S F A K K \* R L S L W S T P V P S P P P L A Q S L K V S P P \*

↓  
редактирование РНК

5'...AAGAUCUCUUUUGCCAAGAAGUAGCGCCUUUCCCUAUGGAGUACCCAGUCCCUUCCCCCCCUCUUUGGCUCAGUCCCUGAAGGUAAGUCCCCCUUAG  
K I S F A K K W R L S L W S T P V P S P P P L A Q S L K V S P P \*

В

5'...AAGAUCUCUUUUGCCAAGAAGUAGCGCCUUUCCCU---AUGGAGUACCCAGUCCCUUCCCCCCCUCUUUGGCUCAGUCCCUGAAGGUAAGUCCCCCUUAG

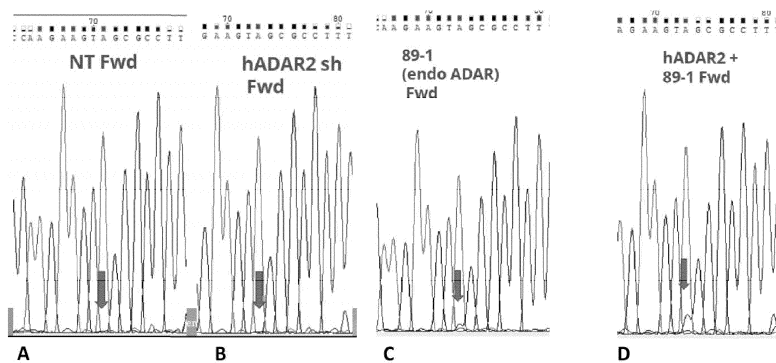
3'-AGGAAACGGUUCUUCACCGUGGAAAAGGAGGUAC-GGAUG-5' (ADAR87-1; SEQ ID NO:18)

3'-AGGAAACGGUUCUUCACCGUGGAAAAGGGA---UACCCUAGGAGUCAG-5' (ADAR89-1; SEQ ID NO:19)

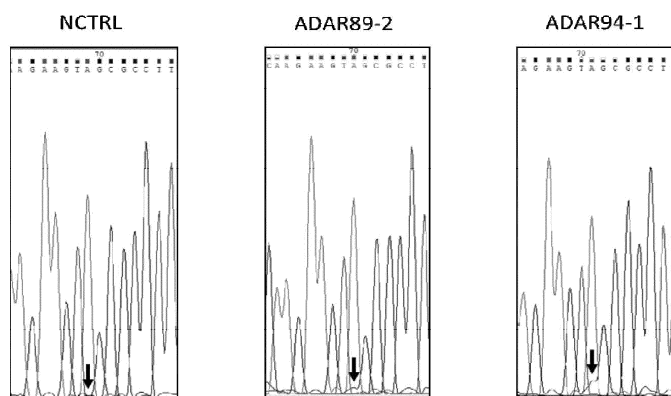
3'-AGGAAACGGUUCUUCACCGUGGAAAAGGGA---UACCCUAGGAGUCAG-5' (ADAR89-2; SEQ ID NO:32)

3'-AGGAAACGGUUCUUCACCGUGGAAAAGAGA---UCCCUAUGGAGUCAG-5' (ADAR94-1; SEQ ID NO:33)

Фиг. 11



Фиг. 12



Фиг. 13

