

一种基于 LEAPER 技术治疗 MPS IH 的方法和组合物

5 技术领域

本申请属于基因编辑治疗领域，具体地，涉及一种基于 LEAPER (Leveraging Endogenous ADAR for Programmable Editing on RNA)技术靶向编辑 RNA 治疗 MPS IH 的方法，其包括利用 LEAPER 技术进行 RNA 上由 A 到 I 碱基的体内位点定向编辑，来治疗由于 G>A 突变导致的疾病，例如 MPS IH。

背景技术

赫勒氏综合征(Hurler syndrome)，又称粘多糖贮积症 IH 型(Mucopolysaccharidoses IH, MPS IH)，或称粘多糖病 IH，是 MPSI 型三种亚型 IH、IH/S、IS 中最严重的一种，它是由于该病患者体内 α -L-艾杜糖醛酸酶(α -L-iduronidase, IDUA)缺乏而引起的一种致残、致死性的遗传性代谢病，为常染色体隐性遗传病(autosomal recessive, AR)。导致赫勒氏综合征的根本原因，是位于人 4 号染色体上 4p16.3 编码 IDUA 蛋白的 IDUA 基因突变导致的，到目前为止它的致病突变有 200 多种，其中最为常见的一种类型是位于 α -L-艾杜糖醛酸苷酶 cDNA 上 1205 位 G 到 A 的突变，该突变导致原本的色氨酸变为终止密码子，进而使最终翻译出来的蛋白上缺乏该位点之后的全部氨基酸(NM_000203.4(IDUA)-c.1205G-A (p.Trp402Ter))而丧失 IDUA 全部酶活性。该突变类型可占到总发病人群的 63% (Worldwide distribution of common IDUA pathogenic variants, Poletto, Edina (2018). Clinical Genetics. 94. 10.1111/cge.13224.)。 α -L-艾杜糖醛酸酶是负责细胞溶酶体(lysosomes)内葡糖胺聚糖(Glycosaminoglycans, GAGs)降解的。Hurler 综合征的病人个体间差异较大，出生时可为正常，3-6 个月时最早出现的征兆为面部轮廓粗糙，随后出现额骨突出、骨骼畸形、生长停滞、语言障碍等症状，病人通常活不过 10 岁。

赫勒氏综合征没有治愈方法，已知目前批准了两种治疗方法：酶替代疗法(ERT)和造血干细胞移植(HSCT)。ERT 在内脏表型方面取得了良好的效果，包括减少肝脏大小，呼吸功能改善，患者活动性全面改善。不利的是，它不能到达中枢神经系统，因此不能阻止认知障碍。另一方面，成功的 HSCT 可预防大多数临床症状，包括神经系统症状，但必须在出现临床症状前进行治疗(最好在 8 个月大之前)，但是由于这种治疗方法的死亡率高所以只适用于病情严重的患者(Combination of enzyme replacement and hematopoietic stem cell transplantation as therapy for Hurler Syndrome. Tolar, J (2008). Bone marrow transplantation. 41. 531-5. 10.1038/sj.bmt.1705934)。

10 目前，在研究的基因编辑技术治疗赫勒氏综合征的原理是利用锌指核糖核酸酶 (zinc finger nuclease, ZFN)和腺相关病毒 (Adeno-associated virus, AAV)将编码正常 IDUA 蛋白的 cDNA 序列定点插入到肝细胞的基因组中，但这种方法仍旧无法解决赫勒氏综合征中大脑骨骼等系统的症状，另外 DNA 编辑所产生的脱靶(off-target)是需要高度关注的问题。

15 理论上，近年来正在飞速发展的基因组编辑技术 CRISPR(Clustered regularly interspaced short palindromic repeats)也可以用来治疗赫勒氏综合征。许多科研工作者和生物技术公司也在致力于将该技术推上临床。例如，2019 年 9 月，首次报道了利用 CRISPR 技术编辑干细胞并将其回输至患者，以治疗其艾滋病和白血病的临床实验结果，为 CRISPR 技术在基因治疗方向的转化做出了巨大的贡献。尽管 CRISPR 技术存在极大的潜在应用前景，但该技术也存在一系列缺陷，导致该技术从科研阶段向临床应用中的转化步履维艰。问题之一便是 CRISPR 技术用到的核心作用酶：Cas9。基于 CRISPR 的 DNA 编辑技术，必须通过外源表达 Cas9 或拥有相似功能的其它核酸酶，从而造成了以下几个问题。首先，通常需要外源表达的核酸酶通常具有较大分子量，这使得通过病毒载体将其递送至体内的效率急剧下降。其次，由于核酸酶的外源表达，使得其存在潜在的核酸酶脱靶可能，这将使得其应用中具有潜在的致癌风险。最后，外源表达的核酸酶是从细菌中发现的，而非人类或哺乳动物天然存在的，这使得其可能引起患者体内的免疫反应，这一方面可能会对患者自身造成损伤，另一方面也可能会使外源表达的核酸酶被中和，从而失去应有的活性，或者阻碍进一步的干预治疗。

20

25

30

2017 年，张锋课题组曾报道一种名为 REPAIR (RNA Editing for Programmable A to I Replacement)的 RNA 编辑技术(RNA editing with CRISPR-Cas13, Cox et al., 2017)，该技术通过外源表达 Cas13-ADAR 融合蛋白及单独向导 RNA (single guide RNA, sgRNA)同样可以实现靶向目标 RNA 的 A 到 I 的编辑，但是该方法同 CRISPR 技术一样，仍需要外源蛋白的表达。无法解决外源蛋白表达造成的问题。

2019 年 1 月，Thorsten Stafforst 课题组曾报道一种名为 RESTORE 核酸编辑技术 (recruiting endogenous ADAR to specific trans for oligonucleotide-mediated RNA editing, Merkle et al., 2019)。该技术能够摆脱对外源蛋白的依赖。但首先 RESTORE 技术需要在 IFN- γ 存在的前提下才能有较高的编辑效率，而 IFN- γ 是决定自体免疫发展和严重程度的关键因子 (Interferon- γ and systemic autoimmunity, Pollard et al., 2013，这使得该技术在医学领域的应用大打折扣。另一方面，RESTORE 技术中同样也用到一段向导 RNA，而其使用的向导 RNA 是化学合成的寡核苷酸，并且其合成的寡核苷酸需要人为引入大量的化学修饰以保证其稳定性。

2019 年，PCT/CN2019/110782 和 PCT/CN2020/084922 申请提供了一种工程改造的 RNA，其与靶转录物部分互补以募集天然 ADAR1 或 ADAR2 以在靶标 RNA 中的特定位点将腺苷变为肌苷，该方法称为“LEAPER(Leveraging Endogenous ADAR for Programmable Editing on RNA)”(利用内源性 ADAR 进行 RNA 的可编程编辑)，而募集 ADAR 的 RNA 可称为“dRNA”或“arRNA”。该 dRNA 包含与靶标 RNA 杂交的互补 RNA 序列，并且所述 dRNA 能够募集作用于 RNA 的腺苷脱氨酶(ADAR)以使靶标 RNA 中的靶标腺苷(A)脱氨基。

25 发明内容

本申请针对 Hurler 综合征 IDUA 致病基因中的 G 到 A 的突变，尤其是占比最高的突变型(NM_000203.4(IDUA)-c.1205G-A (p.Trp402Ter))提供了一种全新的技术方案使其能够精准地在靶标 RNA 上编辑突变位点。

具体地，本申请提供了至少以下技术方案：

1. 一种基于 LEAPER 技术靶向编辑靶标细胞中靶标 RNA 的方法,其中所述靶标 RNA 为 IDUA 基因转录本中含有 G 到 A 突变的 RNA,该方法包括:

5 将包含用于编辑靶标 RNA 的腺苷脱氨酶募集 RNA(arRNA)或编码所述 arRNA 的构建体递送至所述靶标细胞,其中所述 arRNA 包含与所述靶标 RNA 杂交的互补 RNA 序列,并且其中所述 arRNA 能够募集作用于 RNA 的腺苷脱氨酶(ADAR)以使靶标 RNA 中的靶标腺苷(A)脱氨基。

2. 如项 1 中所述的方法,其中所述 arRNA 引入与靶标 A 配对的碱基 C、A、U 或 G。

10 在一些实施方案中,所述 arRNA 引入与靶标 A 配对的碱基 C。在一些实施方案中,所述 arRNA 引入与靶标 A 配对的碱基 A。在一些实施方案中,所述 arRNA 引入与靶标 A 配对的碱基 U。3. 如项 1-2 中任一项所述的方法,其中所述 arRNA 长约 151-61 nt、131-66 nt、121-66 nt、111-66 nt、91-66 nt 或 81-66 nt。本申请公开和涵盖所述数字范围内的任何自然数。

15 4. 如项 3 中所述的方法,其中所述 arRNA 中靶向碱基距离 3'端的长度为 45-5nt, 40-5nt, 35-10nt, 25nt-15n 或 24nt-11nt。本申请公开和涵盖所述数字范围内的任何自然数。

5. 如项 3 或 4 中所述的方法,其中所述 arRNA 中靶向碱基距离 5'端的长度为 80-30nt, 70-35nt, 60-40nt, 55nt-35nt 或 55nt-45nt。本申请公开和涵
20 盖所述数字范围内的任何自然数。

6. 如项 1-5 中所述的方法,其中所述靶标细胞是人的细胞。

7. 项 1-6 中任一项的方法,其中所述靶标 RNA 为包含 NM_000203.4(IDUA)-c.1205G-A (p.Trp402Ter)突变位点的 RNA。

8. 项 1-7 中任一项的方法,其中所述 arRNA 包含以下的序列: SEQ ID
25 NO: 14、SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 17、SEQ ID NO: 22、SEQ ID NO: 23、SEQ ID NO: 30、SEQ ID NO: 31 或 SEQ ID NO: 34。

9. 如项 1-5 中任一项所述的方法,其中所述 arRNA 包含选自以下的序列: SEQ ID NO: 44 或 SEQ ID NO: 52。

30 10. 如项 1-9 中任一项所述的方法,其中所述 arRNA 是经化学修饰的。

11. 如项 10 中所述的方法, 其中所述化学修饰包含 2'-O'-甲基化 (2'-OMe) 或硫代磷酸酯修饰。
12. 如项 11 中所述的方法, 其中所述化学修饰选自如下的一项或多项:
序列前 3 个和后 3 个核苷酸分别被 2'-OMe 修饰,
5 前 3 个和后 3 个核苷酸间连接均为硫代磷酸酯键连接,
序列中全部 U 均被 2'-OMe 修饰,
靶向碱基的 3'最近邻碱基为 2'-OMe 修饰的 A,
靶向碱基的 5'最近邻碱基为 2'-OMe 修饰的 C,
靶向碱基与其 3'最近邻碱基和 5'最近邻碱基分别以硫代磷酸酯键连接,
10 前 5 个和后 5 个核苷酸分别被 2'-OMe 修饰, 和
前 5 个和后 5 个核苷酸间连接为硫代磷酸酯键连接。
在一些具体实施方案中, 所述化学修饰选自如下的一项或多项:
CM1: 序列前 3 个和后 3 个核苷酸分别被 2'-OMe 修饰, 前 3 个和后 3
个核苷酸间连接均为硫代磷酸酯键连接; 同时序列中全部 U 均被 2'-OMe 修
15 饰;
CM2: 序列前 3 个和后 3 个核苷酸分别被 2'-OMe 修饰, 前 3 个和后 3
个核苷酸间连接均为硫代磷酸酯键连接; 同时靶向碱基的 3'最近邻碱基为
2'-OMe 修饰的 A;
CM3: 序列前 3 个和后 3 个核苷酸分别被 2'-OMe 修饰, 前 3 个和后 3
20 个核苷酸间连接均为硫代磷酸酯键连接; 同时靶向碱基的 5'最近邻碱基为
2'-OMe 修饰的 C;
CM4: 序列前 3 个和后 3 个核苷酸分别被 2'-OMe 修饰, 前 3 个和后 3
个核苷酸间连接均为硫代磷酸酯键连接; 同时靶向碱基与其 3'最近邻碱基和
5'最近邻碱基分别以硫代磷酸酯键连接; 以及
25 CM6: 序列前 5 个和后 5 个核苷酸分别被 2'-OMe 修饰, 并且前 5 个和
后 5 个核苷酸间连接为硫代磷酸酯键连接。13. 如项 1-9 中任一项所述的方法,
其中所述编码所述 arRNA 的构建体为线性核酸链、病毒载体或质粒。
14. 如项 13 中所述的方法, 其中所述病毒载体为腺相关病毒(AAV)载体
或慢病毒表达载体。

15. 如项 1-14 中任一项所述的方法, 其中所述递送方式为电转染、脂质体转染、脂质-纳米颗粒(lipid nanoparticle, LNP)递送或感染。

16. 如项 15 中所述的方法, 通过 LNP 将包含用于编辑靶标 RNA 的腺苷脱氨酶募集 RNA(arRNA)或编码所述 arRNA 的构建体递送至所述靶标细胞。

17. 如项 1-16 中任一项所述的方法, 其中所述 arRNA 的递送浓度 ≥ 2.5 , $\geq 5\text{nM}$, $\geq 10\text{nM}$, $\geq 15\text{nM}$, 或 $\geq 20\text{nM}$ 。

在上述实施方案中, 所述靶标细胞包括肝细胞或成纤维细胞。

18. 一种用于通过 LEAPER 技术靶向编辑靶标细胞中靶标 RNA 的 arRNA 或其编码序列, 所述 arRNA 包含如下任一序列或由如下任一序列组成: SEQ ID NO: 14、SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 17、SEQ ID NO: 22、SEQ ID NO: 23、SEQ ID NO: 30、SEQ ID NO: 31、SEQ ID NO: 34、SEQ ID NO: 44 或 SEQ ID NO: 52。

19. 包含项 18 所述 arRNA 或其编码序列的质粒、病毒载体、脂质体或脂质纳米颗粒。

20. 包含项 18 所述 arRNA 或其编码序列、或项 19 所述质粒、病毒载体、脂质体或脂质纳米颗粒的组合物、制剂、试剂盒或生物制品。

21. 一种治疗个体中 MPS IH 的方法, 包括用项 1-17 中任一项所述的方法校正所述个体的靶标细胞中与 MPS IH 疾病相关的 G 到 A 的突变。

22. 项 20 的方法, 其中所述突变为 NM_000203.4(IDUA)-c.1205G-A (p.Trp402Ter)突变。

23. 如项 20 或 21 所述的方法, 其中所述 arRNA 的使用频次为 ≥ 21 天/次、 ≥ 17 天/次、 ≥ 14 天/次或 ≥ 10 天/次。

在一些实施方案中, 本申请还涉及选自如下的序列在制备治疗 MPS IH 疾病的药物中的用途: SEQ ID NO: 14、SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 17、SEQ ID NO: 22、SEQ ID NO: 23、SEQ ID NO: 30、SEQ ID NO: 31、SEQ ID NO: 34、SEQ ID NO: 44 或 SEQ ID NO: 52。

利用本申请的技术方案, 可以安全有效地进行靶细胞(例如肝细胞或成纤维细胞)内 RNA 上由 A 到 I 碱基的体内编辑, 精准地修复致病的突变位

点,例如 NM_000203.4(IDUA)-c.1205G-A (p.Trp402Ter)突变,恢复由 RNA 编码的蛋白在体内的正常表达,实现治疗 MSP IH 的目的。

附图说明

5 图 1 显示了在 GM06214 细胞上检测 IDUA 基因型。

图 2 显示了细胞电转染条件测试。

图 3A-B 显示了针对 IDUA pre-mRNA 和 mRNA 设计 arRNA,对编辑后细胞功能进行检测;和针对 IDUA pre-mRNA 和 mRNA 设计 arRNA,对细胞编辑效率进行检测。

10 图 4A 显示了 IDUA-reporter 细胞系的设计;和图 4B 显示了在 293T-IDUA-Reporter 上检测不同长度 arRNA (对称截短)的编辑效率。

图 5A-B 显示了在 GM06214 细胞上转染不同长度(对称截短)arRNA 后,不同时间点的酶活和编辑效率检测。

15 图 6 显示了在 GM06214 细胞用 lipofectmine RNAiMAX 转染 arRNA(对称截短、3'截短和 5'截短)后, IDUA 酶活性和编辑效率检测。

图 7A 显示了靶向人 IDUA 突变位点的 arRNA 在优选的 55-c-25 到 55-c-10 之间,在 3'端逐个减少碱基,使用 GM06214 细胞通过酶活性检测选出最佳长度。7B 显示了靶向小鼠的 IDUA 突变位点的 arRNA 在 55-c-55 到 55-c-10 之间,在 3'端每 5 个碱基逐渐减少,使用 MPSI 小鼠 MEF 细胞(MSPI
20 MEF (MSPI mouse embryo fibroblast))通过酶活性检测选出最佳 arRNA 长度序列。

图 8A 显示了在优选的 2 个 3'端长度下,逐渐截短 5'端长度以筛选出最优长度范围,图 8B 显示了 3'端长度固定为 14nt 后,5'端逐个碱基截短后形成的 arRNA 对酶活性的影响,综合图 8A 和 8B 筛选出最优的 arRNA 长度。

25 图 9 显示了在优选的 2 个 arRNA 长度下,比较不同种化学修饰对 arRNA 编辑效率(以酶活性体现)的影响。

图 10A-D 显示了在优选的长度和优选的化学修饰方式组合下,在不同的 arRNA 浓度下,人和小鼠 arRNA 编辑 IDUA mRNA 所产生的编辑效率和编辑后产生有功能 IDUA 蛋白的能力。

30 图 11A-D 显示了在优选的长度和优选化学修饰方式组合下,一次转染

后，在不同时间在人或鼠的细胞中测得的 IDUA 酶活性。

图 12A-B 显示在人和小鼠的原代肝脏细胞中，用不同的方式进行 arRNA 的递送，所实现的靶向位点的编辑效率。

图 13 显示在原代培养的人和小鼠肝脏细胞上利用 LNP 递送的靶向 IDUA 的 arRNA 的编辑效率。

图 14 显示经筛选的靶向小鼠 IDUA 突变的 arRNA (SEQ ID NO: 52) 在包装成 LNP 后，以不同浓度通过尾静脉向小鼠给药 24hrs 后，小鼠肝脏细胞中的 IDUA 编辑效率。

10 具体实施方式

定义

RNA 编辑是指存在于真核细胞中的一种天然过程，RNA 编辑是在 DNA 转录之后，蛋白质翻译之前在 RNA 水平上发生的由碱基 A(腺嘌呤)到 I(次黄嘌呤)的编辑，次黄嘌呤在翻译的过程中被识别为 G，RNA 中 A 到 I 的编辑使转录组多样化。通过位点特异和精确改变 RNA 分子的方式将 RNA 的全部数量增加几倍。这种编辑是被 ADAR(Adenosine Deaminase Acting on RNA) 蛋白酶催化产生的，被称为位点定向 RNA 编辑。编辑可以发生的编码区包括内含子和外显子序列，也可以发生在非编码区序列，编码区的编辑可以重新定义蛋白质编码序列。

如本文所用，“LEAPER 技术”即通过使用工程化 RNA 募集内源性 ADAR 进行 RNA 编辑的技术，是指如 WO2020074001A1 中所报道的 RNA 编辑技术。所述工程化 RNA 即腺苷脱氨酶募集 RNA (arRNA)，如本文所用，是指能通过招募 ADAR 或某些包含 ADAR 结构域的复合物在 RNA 中使靶标腺苷脱脱氨基的 RNA。

如本文所用，术语“腺苷脱氨酶 (ADAR)”是指是一类在真核生物（包括人等哺乳动物）各组织中广泛表达的腺苷脱氨酶，能够催化 RNA 分子中腺苷 A 到肌苷 I 的转换。而 I 在真核生物蛋白质合成过程中，通常被当做 G 进行翻译。

如本文所用，核酸的“互补”是指一条核酸通过传统的 Watson-Crick 碱基配对与另一条核酸形成氢键的能力。百分比互补性表示核酸分子中可与另一

核酸分子形成氢键(即, Watson-Crick 碱基配对)的残基的百分比(例如, 10 个中的约 5、6、7、8、9、10 个分别为约 50%, 60%, 70%, 80%, 90%和 100%互补)。“完全互补”是指核酸序列的所有连续残基与第二核酸序列中相同数量的连续残基形成氢键。如本文所用, “基本上互补”是指在约 40、50、60、70、
5 80、100、150、200、250 或更多个核苷酸的区域内, 至少约 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 或 99%中的任何一个的互补程度, 或指在严格条件下杂交的两条核酸。对于单个碱基或单个核苷酸, 按照 Watson-Crick 碱基配对原则, A 与 T 或 U、C 与 G 或 I 配对时, 被称为互补或匹配, 反之亦然; 而除此以外的碱基配对都称为不互补或不匹配。

10 “杂交”是指其中一种或多种多核苷酸反应形成复合物的反应, 所述复合物通过核苷酸残基的碱基之间的氢键稳定。所述氢键可以通过 Watson Crick 碱基配对, Hoogstein 结合或以任何其他序列特异性的方式发生。能够与给定序列杂交的序列称为给定序列的“互补序列”。

如本文所用, 术语“电转染”即电穿孔转染技术, 其通过电场作用于细胞
15 几微秒到几毫秒之后, 在细胞膜上暂时形成小孔或开口, 把大分子如 DNA 等递送至细胞的技术。

如本文所用, 术语“脂质体转染 (Lipo)”是指以脂质体作为体内和体外输送载体的转染技术。脂质体包括中性脂质体和阳离子脂质体, 其中中性脂质体是利用脂质膜包裹大分子, 例如核酸, 借助脂质膜将所述大分子递送至
20 细胞膜内; 阳离子脂质体带正电荷, 其转载的大分子并没有预先包埋其中, 而是由于所述大分子本身带负电荷而自动结合到带正电的脂质体上, 形成大分子-阳离子脂质体复合物, 从而吸附到带负电的细胞膜表面, 经过内吞被递送入细胞。

如本文所用, 术语“脂质-纳米颗粒 (LNP) 递送”是指将大分子, 例如核
25 酸、蛋白质等物质通过脂质纳米颗粒向细胞内进行跨膜递送。其中, 脂质纳米颗粒是指由两相混合合成的颗粒包括含有可电离脂质、辅助磷脂、胆固醇和 PEG 脂的乙醇相和含有核酸、蛋白质等大分子的酸性水相。例如, 包裹有 RNA 的 LNP 可通过内吞进入细胞质内。

在本文中, NM_000203.4(IDUA)-c.1205G-A (p.Trp402Ter)突变是指
30 IDUA 基因编号 000203.4 的转录本中, 1205 位的 G 至 A 的突变, 所述突变

导致所述转录本翻译的肽链的 402 位色氨酸 (Trp) 编码序列转变为终止密码子 (Ter)，使得最终翻译的氨基酸缺失了 402 位之后的全部氨基酸，从而丧失 IDUA 的酶活性。发生这一突变的患者会因为缺乏具有活性的 α -L-艾杜糖醛酸酶而影响细胞溶酶体内葡糖胺聚糖的降解，最终对患者致畸甚至致死。而本申请中的方案可通过在转录水平逆转这一突变，恢复 IDUA 酶的活性。

如本文所用，术语“靶标 RNA”是指待编辑的目标 RNA，其包含待编辑的腺苷 (A)。所述靶标 RNA 可以是成熟的 mRNA，也可以是 mRNA 前体。在本申请中更优选 mRNA 前体。在本文中，包含所述“靶标 RNA”的细胞称为靶标细胞。所述待编辑的腺苷称为“靶标碱基”，“靶标腺苷”或“靶标 A”。在本申请中，“靶标碱基”，“靶标腺苷”或“靶标 A”可以互换使用。在靶标 RNA 的 5' 端与靶标腺苷相邻的碱基称为“5' 相邻碱基”；在靶标 RNA 的 3' 端与靶标腺苷相邻的碱基称为“3' 相邻碱基”；靶标碱基及其 3' 和 5' 相邻碱基组成的碱基三联体在本文中被称为“靶标碱基三联体”。当 arRNA 与靶标 RNA 杂交时，在 arRNA 上与所述靶标碱基相对的碱基称为“靶向碱基”，在 arRNA 的 5' 端与靶向碱基相邻的碱基称为“5' 最近邻碱基”；在 arRNA 的 3' 端与靶向碱基相邻的碱基称为“3' 最近邻碱基”；靶向碱基及其 3' 和 5' 最近邻碱基组成的碱基三联体在本文中被称为“靶向碱基三联体”。

如本文所用，术语“构建体”是指包含某一核酸序列的核酸载体，所述核酸载体可以是线性核酸分子、质粒或病毒载体等。所述核酸分子可以是单链也可以是双链分子。所述核酸序列可以是 DNA 序列也可以是 RNA 序列。在一些实施方案中，所述核酸序列不经过转录、翻译或表达而直接发挥其功能。在一些实施方案中，所述核酸序列为 DNA 序列，其经过转录形成 RNA 后以 RNA 分子形式发挥功能。在一些实施方案中，所述核酸序列为 RNA，其经过翻译后以多肽或蛋白质的形式发挥作用。在一些实施方案中，所述核酸序列为 DNA，其经过转录和翻译步骤形成蛋白质后以蛋白质的形式发挥作用。所述构建体可以通过包装为病毒、脂质纳米颗粒或外泌体等形式进入靶标细胞，亦可以通过电转化、显微注射、化学转化等方式进入靶标细胞。

如本文所用，术语“递送”是指将核酸、蛋白等生物大分子通过某些途径从细胞膜外引入细胞膜内。所述“递送”例如电转染、脂质体转染、脂质-纳米

颗粒递送、病毒递送、外泌体递送等方式。

本申请所用术语“修饰”是指通过化学或生物学方法，例如基因工程方法改变核酸或蛋白的组成或结构，从而使所述核酸或蛋白的一项或多项特性或功能发生改变。

- 5 除非本文另外定义，否则本文使用的所有技术和科学术语具有与本发明所属领域的普通技术人员通常所理解的相同含义。

RNA 编辑方法

- 本申请提供了一种基于 LEAPER 技术靶向编辑靶标细胞中含有 G 到 A 突变的 IDUA 靶标 RNA 的方法，其包括：将包含用于编辑靶标 RNA 的腺苷脱氨酶募集 RNA(arRNA)或编码所述 arRNA 的构建体递送至所述靶标细胞，其中所述 arRNA 包含与所述靶标 RNA 杂交的互补 RNA 序列，并且其中所述 arRNA 能够募集作用于 RNA 的腺苷脱氨酶 (ADAR) 以使靶标 RNA 中的靶标腺苷(A)脱氨基。在一些实施方案中，所述靶标 RNA 是 mRNA 前体。
- 10 在一些实施方案中，所述靶标 RNA 是成熟 mRNA。在一些实施方案中，所述靶标 RNA 为转录有包含 NM_000203.4(IDUA)-c.1205G-A (p.Trp402Ter)突变位点的 IDUA 靶标 RNA。

- 在一些实施方案中，所述 arRNA 包含与靶标 A 配对的碱基 C、A、U 或 G。所述与靶标 A 配对的碱基优选顺序为 C、A、U、G。即在 arRNA 长度一致、靶向碱基距离 5'端的距离一致、靶向碱基距离 3'端的距离一致、并且除靶向碱基以外的 arRNA 序列完全一致的情况下，靶向碱基的优选顺序为 C > A > U > G。当所述靶向碱基为 C 时，所述 arRNA 可以表示为 X nt-c-Y nt，其中 X 表示所述靶向碱基距离 arRNA 的 5'端的距离为 X nt，Y 表示所述靶向碱基距离 arRNA 的 3'端的距离为 Y nt，其中 X 和 Y 可以表示任何自然数。
- 20

- 25 在一些实施方案中，所述靶标细胞是真核细胞。在一些实施方案中，所述靶标细胞是哺乳动物细胞。在一些实施方案中，所述靶标细胞是肝细胞或成纤维细胞。在一些实施方案中，所述靶标细胞是人或小鼠细胞。

- 在一些实施方案中，所述 arRNA 长约 151-61 nt、131-66 nt、121-66 nt、111-66 nt、91-66 nt 或 81-66 nt。在一些实施方案中，所述 arRNA 中靶向碱基距离 3'端的长度为 45-5nt，40-5nt，35-10nt，25nt-15n 或 24nt-11nt。在一
- 30

些实施方案中,所述 arRNA 中靶向碱基距离 5'端的长度为 80-30nt, 70-35nt, 60-40nt, 55nt-35nt 或 55nt-45nt。其中,所述靶向碱基距离 3'端的长度是指将靶向碱基的 3'最近邻碱基至 3'最末端碱基的所有碱基个数;所述靶向碱基距离 5'端的长度是指靶向碱基的 5'最近邻碱基至 5'最末端碱基的所有碱基个数。

在一些实施方案中,所述靶标细胞是人的细胞,且其中所述靶标 RNA 为转录有包含 NM_000203.4(IDUA)-c.1205G-A (p.Trp402Ter) 突变位点的 IDUA 靶标 RNA,则所述 arRNA 的全长 $\geq$ 66nt,例如长约 121-66 nt、111-66 nt、101-66 nt、91-66 nt 或 81-66 nt,即所述 arRNA 的全长选自上述长度范围的任意自然数,例如: 67nt、68nt、69nt、70nt、71nt、72nt、73nt、74nt、75nt、76nt、77nt、78nt、79nt、80nt、81nt、82nt、83nt、84nt、85nt、86nt、87nt、88nt、89nt、90nt、91nt、95nt、100nt、110nt、115nt、120nt。在一些实施方案中,所述 arRNA 中靶向碱基距离 3'端的长度为 45-5nt, 40-5nt, 35-10nt, 25nt-15nt 或 24nt-11nt,即所述 arRNA 的靶向碱基距离 3'端的距离选自上述靶向碱基距离 3'端的长度范围的任意自然数,例如: 12nt、13nt、14nt、16nt、17nt、18nt、19nt、20nt、21nt、22nt、23nt。在一些实施方案中,所述 arRNA 中靶向碱基距离 5'端的长度为 80-30nt, 70-35nt, 60-40nt, 55nt-35nt 或 55nt-45nt,即所述 arRNA 的靶向碱基距离 5'端的距离选自上述靶向碱基距离 5'端的长度范围的任意自然数,例如: 46nt、47nt、48nt、49nt、50nt、51nt、52nt、53nt、54nt。在一些实施方案中,所述 arRNA 包含选自以下的序列: SEQ ID NO: 14、SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 17、SEQ ID NO: 22、SEQ ID NO: 23、SEQ ID NO: 30、SEQ ID NO: 31、SEQ ID NO: 34。

在一些实施方案中,所述靶标细胞是小鼠细胞(例如 W392X 小鼠细胞),且其中所述靶标 RNA 为转录有包含与人 W402X 突变相应的 IDUA 突变的靶标 RNA。在一些实施方案中,所述靶标细胞为 W392X 小鼠细胞。在一些实施方案中,所述 arRNA 长约 121-53nt、111-61nt、101-61nt、91-61nt、81-61nt、111-66nt、或 105-66nt,即所述 arRNA 的全长选自上述长度范围的任意自然数,例如: 67nt、68nt、69nt、70nt、71nt、72nt、73nt、74nt、75nt、76nt、77nt、78nt、79nt、80nt、81nt、82nt、83nt、84nt、85nt、86nt、87nt、88nt、

89nt、90nt、91nt、95nt、100nt、110nt、115nt、120nt。在一些实施方案中，所述 arRNA 中靶向碱基距离 3'端的长度为 55nt-10nt 或 50nt-10nt，即所述 arRNA 的靶向碱基距离 3'端的距离选自上述靶向碱基距离 3'端的长度范围的任意自然数，例如：11nt、12nt、13nt、14nt、16nt、17nt、18nt、19nt、20nt、
5 21nt、22nt、23nt、24nt、25nt、26nt、27nt、28nt、29nt、30nt、31nt、32nt、33nt、34nt、35nt、35nt、37nt、38nt、39nt、40nt、41nt、42nt、43nt、44nt、45nt、46nt、47nt、48nt、49nt、50nt。在一些实施方案中，所述 arRNA 中靶向碱基距离 5'端的长度为 80-30nt，70-35nt，60-40nt，55nt-35nt 或 55nt-45nt，即所述 arRNA 的靶向碱基距离 5'端的距离选自上述靶向碱基距离 5'端的长度范围的任意自然数，例如：33nt、36nt、47nt、46nt、47nt、48nt、49nt、
10 50nt、51nt、52nt、53nt、54nt、60nt、65nt、75nt。在一些实施方案中，所述 arRNA 包含选自以下的序列：SEQ ID NO：44 或 SEQ ID NO：52。

在一些实施方案中，所述 arRNA 是经化学修饰的。在一些实施方案中，所述化学修饰为 2'-O'-甲基化和/或硫代磷酸酯修饰。在一些实施方案中，所述化学修饰选自如下的一项或多项：

序列前 3 个和后 3 个核苷酸分别被 2'-OMe 修饰，
前 3 个和后 3 个核苷酸间连接均为硫代磷酸酯键连接，
序列中全部 U 均被 2'-OMe 修饰，
靶向碱基的 3' 最近邻碱基为 2'-OMe 修饰的 A，
20 靶向碱基的 5' 最近邻碱基为 2'-OMe 修饰的 C，
靶向碱基与其 3' 最近邻碱基和 5' 最近邻碱基分别以硫代磷酸酯键连接，
前 5 个和后 5 个核苷酸分别被 2'-OMe 修饰，和
前 5 个和后 5 个核苷酸间连接为硫代磷酸酯键连接。

25 如本文所述，编码所述 arRNA 的构建体即包含所述 arRNA 编码序列的构建体。在一些实施方案中，所述 arRNA 在所述编码所述 arRNA 的构建体被递送入靶标细胞后，由编码所述 arRNA 的构建体转录而成。在一些实施方案中，所述编码所述 arRNA 的构建体为线性核酸链、病毒载体或质粒。在一些实施方案中，所述病毒载体为腺相关病毒(AAV)或慢病毒。在一些实施方案中，当所述编码所述 arRNA 的构建体被递送入靶标细胞时，其通过
30

同源重组或非同源重组等方式将编码所述编码 arRNA 的序列插入靶标细胞基因组，从而持续转录生成所述 arRNA。在一些实施方案中，所述编码所述 arRNA 的构建体被递送入靶标细胞时，其使编码所述 arRNA 的序列作为游离核酸的一部分存在于靶标细胞中，从而所述编码所述 arRNA 的序列可以在一定的时间内转录生成所述 arRNA。

在一些实施方案中，所述递送为电转染、脂质体转染或脂质-纳米颗粒 (lipid nanoparticle, LNP) 递送或感染。在一些实施方案中，当所述靶标细胞为肝脏细胞时，所述递送为 LNP 递送。在一些实施方案中，当所述靶标细胞为成纤维细胞时，所述递送为脂质体转染。在一些实施方案中，所述 arRNA 的递送浓度 $\geq 2.5\text{-}5\text{nM}$ ，优选地 $\geq 10\text{-}20\text{nM}$ ，例如 $\geq 15\text{nM}$ 。在本申请中，所述递送浓度是指在将所述 arRNA 构建体递送至所述靶标细胞时，一单位体积 arRNA 与所述靶标细胞所在的递送体系中所含有的 arRNA 的量。所述递送体系包含 arRNA 或其构建体、靶标细胞及所述 arRNA 及靶标细胞周围的液体基质。在一些实施方案中，所述液体基质可以是细胞培养基、PBS 或其他可在一定时间内维持细胞稳定生存状态的，与胞浆等渗的溶液。在一些实施方案中，所述递送体系还包含可促进递送的试剂。

arRNA

本申请还提供了一种 arRNA，其可用于基于 LEAPER 技术靶向编辑靶标细胞中的靶标 RNA，例如转录有包含 NM_000203.4(IDUA)-c.1205G-A (p.Trp402Ter) 突变位点的靶标 RNA，以使靶标 RNA 中的靶 A 脱氨基称为次黄嘌呤 I。而在靶标细胞后续的翻译过程中，I 会被识别为 G，从而将 G>A 的突变恢复为 G，使得经 arRNA 编辑后，靶标 RNA 可翻译为正确的蛋白。在一些实施方案中，所述靶标 RNA 是 mRNA 前体。在一些实施方案中，所述靶标 RNA 是成熟 mRNA。

在一些实施方案中，所述 arRNA 引入与靶标 A 配对的碱基 (靶向碱基) 编辑效率从大到小为 C、A、U、G。在一些实施方案中，所述 arRNA 中除靶向碱基外，其他碱基均可与靶标 RNA 互补配对。在一些实施方案中，所述 arRNA 中除靶向碱基外，还有一个或多个碱基与靶标 RNA 形成错配。

在一些实施方案中，所述靶标细胞是真核细胞。在一些实施方案中，所

述靶标细胞是哺乳动物细胞。在一些实施方案中,所述靶标细胞是肝细胞或成纤维细胞。在一些实施方案中,所述靶标细胞是人或小鼠细胞(例如 W392X 小鼠细胞)。

5 在一些实施方案中,所述 arRNA 长约 151-61 nt、131-66 nt、121-66 nt、111-66 nt、91-66 nt 或 81-66 nt。在一些实施方案中,所述 arRNA 中靶向碱基距离 3'端的长度为 45-5nt, 40-5nt, 35-10nt, 25nt-15n 或 24nt-11nt。在一些实施方案中,所述 arRNA 中靶向碱基距离 5'端的长度为 80-30nt, 70-35nt, 60-40nt, 55nt-35nt 或 55nt-45nt。其中,所述靶向碱基距离 3'端的长度是指将靶向碱基的 3'最近邻碱基至 3'最末端碱基的所有碱基个数;所述靶向碱基
10 距离 5'端的长度是指靶向碱基的 5'最近邻碱基至 5'最末端碱基的所有碱基个数。

在一些实施方案中,所述靶标细胞是人的细胞,且其中所述靶标 RNA 为转录有包含 NM_000203.4(IDUA)-c.1205G-A (p.Trp402Ter) 突变位点的 IDUA 靶标 RNA,则所述 arRNA 的全长 $\geq$ 66nt,例如长约 121-66 nt、111-66 nt、
15 101-66 nt、91-66 nt 或 81-66 nt,即所述 arRNA 的全长选自上述长度范围的任意自然数,例如: 67nt、68nt、69nt、70nt、71nt、72nt、73nt、74nt、75nt、76nt、77nt、78nt、79nt、80nt、81nt、82nt、83nt、84nt、85nt、86nt、87nt、88nt、89nt、90nt、91nt、95nt、100nt、110nt、115nt、120nt。在一些实施方案中,所述 arRNA 中靶向碱基距离 3'端的长度为 45-5nt, 40-5nt, 35-10nt, 25nt-15nt 或 24nt-11nt,即所述 arRNA 的靶向碱基距离 3'端的距离选自上述
20 靶向碱基距离 3'端的长度范围的任意自然数,例如: 12nt、13nt、14nt、16nt、17nt、18nt、19nt、20nt、21nt、22nt、23nt。在一些实施方案中,所述 arRNA 中靶向碱基距离 5'端的长度为 80-30nt, 70-35nt, 60-40nt, 55nt-35nt 或 55nt-45nt,即所述 arRNA 的靶向碱基距离 5'端的距离选自上述靶向碱基距
25 离 5'端的长度范围的任意自然数,例如: 46nt、47nt、48nt、49nt、50nt、51nt、52nt、53nt、54nt。在一些实施方案中,所述 arRNA 包含选自以下的序列: SEQ ID NO: 14、SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 17、SEQ ID NO: 22、SEQ ID NO: 23、SEQ ID NO: 30、SEQ ID NO: 31、SEQ ID NO: 34。

30 在一些实施方案中,所述靶标细胞是小鼠细胞(例如 W392X 小鼠细胞),

且其中所述靶标 RNA 为转录有包含与人 W402X 突变相应的 IDUA 突变的靶标 RNA, 则所述 arRNA 长约 121-53nt、111-61nt、101-61nt、91-61nt、81-61nt、111-66nt、或 105-66nt, 即所述 arRNA 的全长选自上述长度范围的任意自然数, 例如: 67nt、68nt、69nt、70nt、71nt、72nt、73nt、74nt、75nt、76nt、
5 77nt、78nt、79nt、80nt、81nt、82nt、83nt、84nt、85nt、86nt、87nt、88nt、89nt、90nt、91nt、95nt、100nt、110nt、115nt、120nt。在一些实施方案中, 所述 arRNA 中靶向碱基距离 3'端的长度为 55nt-10nt 或 50nt-10nt, 即所述 arRNA 的靶向碱基距离 3'端的距离选自上述靶向碱基距离 3'端的长度范围的任意自然数, 例如: 11nt、12nt、13nt、14nt、16nt、17nt、18nt、19nt、20nt、
10 21nt、22nt、23nt、24nt、25nt、26nt、27nt、28nt、29nt、30nt、31nt、32nt、33nt、34nt、35nt、35nt、37nt、38nt、39nt、40nt、41nt、42nt、43nt、44nt、45nt、46nt、47nt、48nt、49nt、50nt。在一些实施方案中, 所述 arRNA 中靶向碱基距离 5'端的长度为 80-30nt, 70-35nt, 60-40nt, 55nt-35nt 或 55nt-45nt, 即所述 arRNA 的靶向碱基距离 5'端的距离选自上述靶向碱基距离 5'端的长度范围的任意自然数, 例如: 33nt、36nt、47nt、46nt、47nt、48nt、49nt、
15 50nt、51nt、52nt、53nt、54nt、60nt、65nt、75nt。在一些实施方案中, 所述 arRNA 包含选自以下的序列: SEQ ID NO: 44 或 SEQ ID NO: 52。

在一些实施方案中, 所述 arRNA 由编码所述 arRNA 的构建体转录表达而成。在一些实施方案中, 所述 arRNA 由编码所述 arRNA 的构建体在体外
20 转录表达, 并经纯化获得。在一些实施方案中, 所述 arRNA 由编码所述 arRNA 的构建体在体内直接表达并发挥编辑作用。在一些实施方案中, 所述构建体选自病毒载体、质粒和线性核酸。在一些实施方案中, 所述病毒为 AAV 或慢病毒。

在一些实施方案中, 所述 arRNA 由化学合成。在一些实施方案中, 所述
25 所述 arRNA 是经化学修饰的。在一些实施方案中, 所述化学修饰为 2'-O'-甲基化和/或硫代磷酸酯修饰。在一些实施方案中, 所述化学修饰选自如下的一项或多项:

序列前 3 个和后 3 个核苷酸分别被 2'-OMe 修饰,
前 3 个和后 3 个核苷酸间连接均为硫代磷酸酯键连接,
30 序列中全部 U 均被 2'-OMe 修饰,

靶向碱基的 3' 最近邻碱基为 2'-OMe 修饰的 A，
靶向碱基的 5' 最近邻碱基为 2'-OMe 修饰的 C，
靶向碱基与其 3' 最近邻碱基和 5' 最近邻碱基分别以硫代磷酸酯键连接，

5 前 5 个和后 5 个核苷酸分别被 2'-OMe 修饰，和
前 5 个和后 5 个核苷酸间连接为硫代磷酸酯键连接。

在一些实施方案中，所述化学修饰选自如下的一项或多项：

CM1：序列前 3 个和后 3 个核苷酸分别被 2'-OMe 修饰，前 3 个和后 3
10 个核苷酸间连接均为硫代磷酸酯键连接；同时序列中全部 U 均被 2'-OMe 修
饰；

CM2：序列前 3 个和后 3 个核苷酸分别被 2'-OMe 修饰，前 3 个和后 3
个核苷酸间连接均为硫代磷酸酯键连接；同时靶向碱基的 3'最近邻碱基为
2'-OMe 修饰的 A；

CM3：序列前 3 个和后 3 个核苷酸分别被 2'-OMe 修饰，前 3 个和后 3
15 个核苷酸间连接均为硫代磷酸酯键连接；同时靶向碱基的 5'最近邻碱基为
2'-OMe 修饰的 C；

CM4：序列前 3 个和后 3 个核苷酸分别被 2'-OMe 修饰，前 3 个和后 3
个核苷酸间连接均为硫代磷酸酯键连接；同时靶向碱基与其 3'最近邻碱基和
5'最近邻碱基分别以硫代磷酸酯键连接；以及

20 CM6：序列前 5 个和后 5 个核苷酸分别被 2'-OMe 修饰，并且前 5 个和
后 5 个核苷酸间连接为硫代磷酸酯键连接。

构建体

本申请还提供了一种编码前述 arRNA 的构建体。在一些实施方案中，
25 所述构建体选自病毒载体、质粒和线性核酸。在一些实施方案中，所述病毒
载体为 AAV 载体或慢病毒表达载体。

本申请还进一步提供了包含所述构建体的病毒、直至纳米颗粒、脂质体、
外泌体或细胞。

30 制剂和生物制品

本申请还提供了包含前述任一种 arRNA 或前述任一种构建体的组合物、制剂和生物制品，其可用于编辑靶标细胞中转录有包含 NM_000203.4(IDUA)-c.1205G-A (p.Trp402Ter)突变位点的靶标 RNA，以恢复 IDUA 基因的正常功能。在一些实施方案中，所述 arRNA 或构建体包裹在脂质体中。在一些实施方案中，所述 arRNA 或所述构建体经制备形成脂质纳米颗粒。在一些实施方案中，所述 arRNA 或所述构建体通过病毒递送方式（例如腺相关病毒或慢病毒）导入受试者体内。

在一些实施方案中，所述包含 arRNA 的制剂为一种治疗药剂，可输入患者体内用于疾病的治疗。在一些实施方案中，所述输入为局部注射、局部灌注或静脉输注、局部灌注或局部注射。在一些实施方案中，所述药剂为适于肝脏局部注射的剂型，例如肝脏动脉灌注。在一些实施方案中，所述药剂为适于肌肉注射的剂型。在一些实施方案中，所述药剂为适于静脉注射的剂型。

15 试剂盒

本申请同时还提供了一种用于编辑靶标细胞中的靶标 RNA 的试剂盒，其包含如前所述的 arRNA、如前所述的编码所述 arRNA 的构建体或如前所述的制剂。所述试剂盒可用于靶向编辑靶标细胞中转录有包含 NM_000203.4(IDUA)-c.1205G-A (p.Trp402Ter)突变位点的靶标 RNA。

20 在一些实施方案中，所述试剂盒包含如前所述的 arRNA 或如前所述的编码所述 arRNA 的构建体，以及助染试剂，所述 arRNA 或构建体以及助染试剂分装于不同的容器。在一些实施方案中，所述助染试剂为脂质溶液。例如：英潍捷基的 Lipo (lipofectmine RNAiMAX 货号：13778150) 或与其具有相同功能成分的试剂。

25 在一些实施方案中，所述试剂盒还包含使用说明，以告知使用者所述试剂盒中包含的各种成分及其含量，和/或所述试剂盒的使用方法。

疗法

30 本申请还进一步提供了一种治疗个体中粘多糖贮积症 IH 型的方法，包括使用如前所述的方法校正个体细胞中与 IDUA 基因的 G 到 A 的突变，例

如 NM_000203.4(IDUA)-c.1205G-A (p.Trp402Ter)突变。在一些实施方案中，所述疾病包括赫勒氏综合征。在一些实施方案中，当所述个体为人时，其中 arRNA 的使用频次为 ≥ 21 天/次、 ≥ 17 天/次、 ≥ 14 天/次或 ≥ 10 天/次。在一些实施方案中，当所述个体为小鼠时，其中 arRNA 的使用频次为 ≥ 8 天/次。在
5 一些实施方案中，所述疗法使用编码所述 arRNA 的构建体，并且所述构建体可将编码所述 arRNA 的序列整合入靶标细胞，则所述 arRNA 的使用频次为单次。

本申请提供的利用 LEAPER 技术对 RNA 进行靶向编辑的方法，具有以下优点：

10 1. 该方法不依赖于外源蛋白的表达，因此，不会由于蛋白分子量过大使得通过病毒载体进行装载及人体内递送十分困难；不会由于外源蛋白过表达引起的脱靶效应；不会导致由外源蛋白表达引起的机体免疫反应及损伤；也不会由于机体内的预存抗体使外源编辑酶或效应蛋白被中和从而导致基因编辑失败。

15 2. 本申请提供的这种酶导向特定位点 RNA 编辑方法与 DNA 编辑不同，RNA 编辑是可逆和可调控的。通过重新编码氨基酸密码子可以对疾病进行治疗，对蛋白质和 RNA 功能进行研究。由于 RNA 编辑潜在的副作用是可逆的，因此更安全。

20 3. 与现有技术相比，该方法不仅可以通过化学合成 arRNA 后，经电转染或脂质体转染完成，也可以通过腺相关病毒(AAV)、慢病毒等载体递送至患者发挥功能，这使得其递送手段的选择上更加灵活多变，编辑效率更高。

25 以上详细描述了本发明的优选实施方式，但是，本发明并不限于此。在本发明的技术构思范围内，可以对本发明的技术方案进行多种简单变型，包括各个技术特征以任何其它的合适方式进行组合，这些简单变型和组合同样应当视为本发明所公开的内容，均属于本发明的保护范围。

下面结合具体实施例，对本发明的技术方案作进一步的详述，但本发明并不限于以下实施例。如未特别指出，以下所涉及的试剂均可通过商业途径购得。为简便起见，部分操作未详述操作的参数、步骤及所使用的仪器，应当理解，这些都是本领域技术人员所熟知并可重复再现的。本文中所使用的
30 细胞 (GM06214) 够买于美国 Coriell 公司，是一株来源于 Hurler 综合征病

人的成纤维细胞。编辑用 arRNA 是由美国 Synthego 公司或苏州贝信生物技术有限公司合成, Sanger 测序由北京睿博生物技术有限公司完成, 二代测序由诺禾致源生物信息科技有限公司或中科院水稻所测序平台完成。

5 实施例

实施例 1: 检测 GM06214 突变基因型

将 GM06214 细胞 (赫尔勒氏综合症 (Hurler syndrome) 患者来源的成纤维母细胞) 放入含有 15% 血清的成纤维细胞培养液 (ScienCell, FM 培养基, 货号: 2301) 中, 添加 1% 成纤维细胞生长添加物 (ScienCell, GFS, 货号: 2301),
10 在 37°C、5%CO₂ 培养箱里培养 2-3 天。待细胞融合度达到 90% 时, 用 0.25% 的胰酶消化后, 含有 15% 血清的成纤维细胞培养液终止消化。用 TianGene® (TIANGEN Biotech(Beijing)Co.,Ltd.) 细胞 DNA 提取试剂盒 (货号: DP304-03) 根据操作说明进行 DNA 提取。

利用 NCBI-Primer blast (网址: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) 进行 IDUA 突变位点上下游序列的引物设计。SEQ ID NO 1: CGCTTCCAGGTCAACAACAC (正向引物 hIDUA-F1); SEQ ID NO 2: CTCGCGTAGATCAGCACCG (反向引物 hIDUA-R1)。进行 PCR 反应, PCR 产物进行 Sanger 测序。确定细胞的突变型是 IDUA 基因组上第 15704 位点 G 变为 A 的致病型, 如图 1 所示。

20

实施例 2: GM06214 细胞电转染条件筛选

待 GM06214 细胞生长至约 90% 汇合度时消化细胞, 终止消化后计数。电转染时, 用预混合电转染液 (Lonza, 货号: V4XP-3024) 400ul 重悬 600 万个细胞, 再加 20ug 的 GFP 质粒 (Lonza, 货号: V4XP-3024, 混匀后, 取
25 每 20ul 为一个电转染体系, 用 Lonza 核电转染仪测试 7 个电转染条件 (参见图 2) 加一个阴性对照共 8 个, 每个条件做 2 个重复。电转染后, 将细胞迅速转入 2ml 含有 15% 血清的成纤维细胞培养液 (ScienCell, FM 培养基, 货号: 2301) 中, 每个条件的细胞分 2 个孔 (6 孔板) 接种在培养板中, 将细胞放入 37°C、5%CO₂ 培养箱培养。电转染后 24 小时, 消化每个电转染条件 2
30 孔细胞中的一孔细胞, 利用流式细胞仪测 GFP 阳性细胞的比例。电转染后

48 小时,消化每个电转染条件 2 孔细胞中的另一孔细胞,利用流式细胞仪测 GFP 阳性细胞的比例。得到细胞的最佳电转染条件为 CA-137 组的电转染条件,如图 2 所示。

5 实施例 3: GM06214 细胞电转染 arRNA 后 IDUA 酶活性和编辑效率研究

针对 IDUA 基因转录后 pre-mRNA(mRNA 前体)和 mature-mRNA (成熟 mRNA) 突变位点上下游序列,设计合成以下 arRNA 序列: SEQ ID NO 3: GACGCCCACCGUGUGGUUGCUGUCCAGGACGGUCCCGGCCUGCGAC ACUUCGGCCCCAGAGCUGCUCCUCAUCCAGCAGCGCCAGCAGCCCCAU
10 GGCCGUGAGCACCGGCUU (Pre-55nt-c-55nt); SEQ ID NO 4: GACGCCCACCGUGUGGUUGCUGUCCAGGACGGUCCCGGCCUGCGAC ACUUCGGCCCCAGAGCUGCUCCUCAUCUGCGGGGGCGGGGGGGGGCCG UCGCCGCGUGGGGGUCGUUG (m-55nt-c-55nt); SEQ ID NO 5: UACCGCUACAGCCACGCUGAUUUCAGCUAUACCUGCCCGGUAUAAA
15 GGGACGUUCACACCGCGAUGUUCUCUGCUGGGGAAUUGCGCGAUAU UCAGGAUUAAAAGAAGUGC (Random-111nt), 其中,合成的 arRNA 中突变位点对应的碱基由 T 变成 C,形成一个 A-C 错配。合成 arRNA 的长度优选在 111nt。利用实施例 2 得到的最佳电转染条件对细胞进行电转染,电转染后 48 小时,收集细胞,进行酶活测定和编辑效率检测。

20

编辑效率检测:

用无 RNase 的水(全式金,货号:GI201-01,)将设计合成的 arRNA 溶解至需要的浓度,-80℃保存。待 GM06214 细胞生长至约 90%汇合度时消化细胞,终止消化后计数。取 100 万个细胞,添加 200pmol 的 arRNA,至 100ul
25 体积,CA-137 条件下电转染。电转染后 48 小时,对细胞计数,并测活率。将细胞移入无 RNA 酶的离心管中离心后弃上清,用 QIAGEN RNA 提取试剂盒提 RNA(QIAGEN,货号:74134)。根据说明书,按 5×10^5 个细胞加入 0.35ml 的 Buffer RLT Plus 吹打混匀(若是冻存细胞直接提 RNA,建议用 PBS 洗一次)。将裂解后的细胞液加入 gDNA Eliminator 旋转离心柱(spin column),
30 在 ≥ 8000 g 离心 30s,扔掉柱子留下液体。加入一倍体积的 70%的乙醇,吹打

- 混匀,立即进行下一步。将液体加入 RNeasyMinElute 旋转离心柱中,在 ≥ 8000 g 离心 15 s,弃废液。向 RNeasyMinElute 旋转离心柱中添加 700 μ l 的 Buffer RW1,在 ≥ 8000 g 离心 15 s,弃废液。向 RNeasyMinElute 旋转离心柱中添加 500 μ l 的 Buffer RPE,在 ≥ 8000 g 离心 15 s,弃废液。向 RNeasyMinElute 旋
- 5 转离心柱中添加 500 μ l 80%的乙醇,在 ≥ 8000 g 离心 2 分钟,弃废液。将 RNeasyMinElute 旋转离心柱放到一个新的 2 ml 的收集柱中,开盖最高速度离心 5 分钟以便柱子干燥。将 RNeasyMinElute 旋转离心柱放到一个新的 1.5 ml 的收集柱中,在柱膜中心位置滴加 14 μ l 无 RNase 水,最大速度离心 1 分钟洗脱 RNA。
- 10 将提取的 RNA 用 Nanodrop (Thermo, 货号: Nanodrop2000) 测浓度,用 1 μ g RNA 做反转录 (Thermo, 逆转录酶货号: 28025013)。如表 1 配置反转录体系,65 $^{\circ}$ C 温育 5 分钟后,立即冰浴冷却。37 $^{\circ}$ C 继续温育 50 分钟。70 $^{\circ}$ C, 15 分钟灭活反转录酶。在表 3 所示条件下,进行 PCR。PCR 结束后,取 2 μ l PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳,根据电泳结果初步判定 PCR 产物的浓度以
- 15 及条带大小是否正确等。纯化后,PCR 产物建库,送二代测序。

表 1. 反转录体系配置-1

	体积 (ul)
总 RNA(1ug)	X
Oligo dT	1
10nM dNTP	1
RNase-Free Water	10-X
总体积	12

65 $^{\circ}$ C, 5 分钟,立即转移到冰上。

表 2. 反转录体系配置-2

	体积 (ul)
表 1 体系	12ul
5X First-Strand Buffer	4
0.1 M DTT	2
RNaseOUT™ Recombinant Ribonuclease Inhibitor	1

M-MLV	1
总体积	20

表 3. PCR 条件

步骤	时间	循环
98°C	2min	1 cycle
98°C	15s	28-35 cycle
63°C	30s	
72°C	15s	
72°C	2min	1 cycle

酶活性检测：

将 GM06214 细胞消化后离心，用 28ul 含 0.1% Triton X-100 的 1×PBS
5 重新悬浮在冰上裂解 30 分钟。然后将 25ul 的细胞裂解液添加到 25ul 含 190μm
4-甲基伞形酮-α-L-异丁烯酸酶（4-methylumbelliferyl-α-L-iduronidase）的底
物中（Cayman, 2A-19543-500，溶解于 0.4 M 甲酸钠缓冲液中，含有 0.2%
Triton X-100，PH3.5）。在暗处，37°C 孵育 90 分钟。加入 200ul 0.5M
NaOH/Glycine 溶液（北京化工，NAOH，货号：AR500G；索莱宝，Glycine
10 货号：G8200,），PH 10.3，灭活催化反应。在 4°C 离心 2 分钟。上清液被转
移到 96 孔板上，荧光值测量用 365nm 激发波长和 450nm 激发射波长，使用
Infinite M200 仪器(TECAN)。

在本申请中，所有酶活性检测结果数据均以 GM01323 细胞中酶活性的
倍数来表示。其中，GM01323 细胞是来源于 Scheie 综合征患者的成纤维细
15 胞。Scheie 综合征是黏多糖贮积症中较为轻微的一种，症状比 Hurler 综合征
轻得多。Scheie 综合征患者往往预后较好，寿命一般为正常，可活至成年。
Scheie 综合征患者的成纤维细胞中 IDUA 酶活性是健康人野生型成纤维细胞
的 0.3%。

如图 3 所示，结果显示，当 arRNA 靶向 mRNA 前体（pre-mRNA）时能
20 够表现出较高的酶活性和编辑效率，而靶向成熟 mRNA(mature-mRNA)的
arRNA 表现出明显低的酶活性和编辑效率。因此在后面的实施例中所涉及到
的 arRNA 均是靶向 mRNA 前体（pre-mRNA）的。

实施例 4: 在 IDUA-报告子细胞系上电转染 arRNA 后 IDUA 靶位点编辑效率的检测

如图 4A 所示, 在慢病毒质粒上表达 mCherry 和 GFP 蛋白的序列之间插入了一段携带 IDUA 突变位点及上下游有各 100bp 左右的序列, 构建质粒。将上述构建后的质粒包装成病毒, 感染 293T 细胞, 待其整合进基因组后, 筛选出 IDUA-报告子 (reporter) 单克隆细胞。这个单克隆细胞因为受到插入序列中 IDUA 突变位点 TAG 终止密码子的影响, 只表达 mCherry 蛋白, 而当细胞被 arRNA 编辑后, 发生 TAG->TGG, 其后面的 GFP 蛋白才能够正常表达, GFP 蛋白的表达可以看作是 arRNA 编辑细胞的编辑效率。我们优选设计了 4 条从 51nt-111nt 不同长度的 arRNA, 如下表 4 所示, 细胞以实施例 2 中的电转染条件电转染不同长度的 arRNA 后, 分别在第 1-第 7 天检测细胞中 GFP 的比率, 对编辑效率进行初步检测。从图 4B 中可以看编辑效率最高的序列是 91nt: 45-c-45, 编辑的最高峰出现在第 2 天 (48h)。由此可见, 在 arRNA 的长度方面, 并不是序列越长编辑效率越高。

表 4:

111nt-随机 (random)	SEQ ID NO 5: uaccgcucacgccacgcugauuucagcuauaccugcccgguaauaaggagcguucacaccgcgauguucucugcugg ggauuugcgcgaauuucaggauuaaaagaagugc
91nt-随机	SEQ ID NO 6: uaauccugaauaucgcgcaauuccccagcagagaacaucgcggugugaacguccuuuauaccgggcaggauuagcu gaaucagcggugc
71nt-随机	SEQ ID NO 7: uuucagcuauaccugcccgguaauaaggagcguucacaccgcgauguucucugcuggggaauugcgcgga
51nt-随机	SEQ ID NO 8: uuccccagcagagaacaucgcggugugaacguccuuuauaccgggcaggu
55nt-c-55nt	SEQ ID NO 4: gacgccaccgugugguugcuguccaggacggucccgccugcgacacuucggccagagcugcuccucaucugcgg ggcgggggggggccgucgccguggggucguug
45nt-c-45nt	SEQ ID NO 9: gugugguugcuguccaggacggucccgccugcgacacuucggccagagcugcuccucaucugcggggcgggggg

	gggccgucgccgcu
35nt-c-35nt	SEQ ID NO 10: uguccaggacgguccggccugcgacacuucggccagagcugcuccucaucugcggggcggggggggcc
25nt-c-25nt	SEQ ID NO 11: ggucccgccugcgacacuucggccagagcugcuccucaucugcggggcg

实施例 5：不同长度的 arRNA 电转染 GM06214 细胞后，检测不同时间点的细胞内 IDUA 酶活性和细胞内 RNA 编辑效率

利用实施例 2 的电转染条件在 GM06214 细胞上电转染不同长度的 arRNA（参见表 4），以实施例 3 中的方法，分别在电转染后第 2，4，6，8，10，12，14 天检测了细胞内的酶活性，在第 2 和 4 天检测了细胞内 RNA 被编辑的效率。从结果上看，如图 5 所示，91nt：45-c-45 酶活性最高，在电转染后第 6 天 IDUA 酶活性仍然维持在高水平。从编辑效率上看，91nt 和 111nt 呈现了大致相同的编辑效率。

10

实施例 6：编辑位点 A 对应于 arRNA 的不同位置的编辑效率

以 111nt 长度的 arRNA 为例，从突变位点两端同时截断和从 5'端或 3'端二端分别截断，研究靶向碱基对应于 arRNA 不同位置的编辑效率。

本实验研究以 lipofectmine RNAiMAX 方式将 arRNA 导入细胞。首先我们将 arRNA 序列从两端同时截短，之后扩展到固定一端从另一端截短，得到 14 条 arRNA 和 4 个等长的随机序列，如下表 5 所示。通过转染后 48 小时 IDUA 酶活性和 RNA 编辑效率的检测发现，81nt：55nt-c-25nt（SEQ ID NO：14），71nt：55nt-c-15nt（SEQ ID NO：15），91nt：45nt-c-45nt（SEQ ID NO：9），91nt：55nt-c-35nt（SEQ ID NO：13），101nt：45nt-c-55nt（SEQ ID NO：17）在所检测的序列中 IDUA 酶活性和 RNA 编辑效率优于其它序列，如图 6 所示。

15

表 5：

111nt-random	SEQ ID NO 5: uaccgcucagccacgcgauuucagcuauaccugcccgguaaaaaggacguucacaccgcgauguucucugcug gggaauugcgcgauuucaggauuaaagaaguc
91nt-random	SEQ ID NO 6:

	uaauccugaauaucgcgcaauuccccagcagagaacaucgcggugugaacguccuuuauaccgggcagguauagc ugaaaucagcguaggc
71nt-random	SEQ ID NO 7: uuucagcuauaccugcccgguaauaaggagacguucacaccgcgauguucucugcuggggaauugcgcgaaua
51nt-random	SEQ ID NO 8: uuccccagcagagaacaucgcggugugaacguccuuuauaccgggcaggu
55nt-c-55nt	SEQ ID NO 4: gacgccaccgugugguugcuguccaggacgguccggccugcgacacuucggcccagagcugcuccucaucugcg ggggcggggggggccgucgccgcguggggucguug
45nt-c-45nt	SEQ ID NO 9: gugugguugcuguccaggacgguccggccugcgacacuucggcccagagcugcuccucaucugcggggcggggg ggggccgucgccgcgu
35nt-c-35nt	SEQ ID NO 10: uguccaggacgguccggccugcgacacuucggcccagagcugcuccucaucugcggggcggggggggcc
25nt-c-25nt	SEQ ID NO 11: gguccggccugcgacacuucggcccagagcugcuccucaucugcggggcg
55nt-c-45nt	SEQ ID NO 12: gacgccaccgugugguugcuguccaggacgguccggccugcgacacuucggcccagagcugcuccucaucugcg ggggcggggggggccgucgccgcgu
55nt-c-35nt	SEQ ID NO 13: gacgccaccgugugguugcuguccaggacgguccggccugcgacacuucggcccagagcugcuccucaucugcg ggggcggggggggcc
55nt-c-25nt	SEQ ID NO 14: gacgccaccgugugguugcuguccaggacgguccggccugcgacacuucggcccagagcugcuccucaucugcg ggggcg
55nt-c-15nt	SEQ ID NO: 15 gacgccaccgugugguugcuguccaggacgguccggccugcgacacuucggcccagagcugcuccucau
55nt-c-5nt	SEQ ID NO: 16 gacgccaccgugugguugcuguccaggacgguccggccugcgacacuucggcccagagc
45nt-c-55nt	SEQ ID NO: 17 gugugguugcuguccaggacgguccggccugcgacacuucggcccagagcugcuccucaucugcggggcggggg ggggccgucgccgcguggggucguug

35nt-c-55nt	SEQ ID NO: 18 uguccaggacggucccgccugcgacacuuaggccagagcugcuccucaucugcggggcgggggggggccgucg ccgcguggggucguug
25nt-c-55nt	SEQ ID NO: 19 ggucccgccugcgacacuuaggccagagcugcuccucaucugcggggcgggggggggccgucgccgcgugggg ucguug
15nt-c-55nt	SEQ ID NO: 20 ugcgacacuuaggccagagcugcuccucaucugcggggcgggggggggccgucgccgcguggggucguug
5nt-c-55nt	SEQ ID NO: 21 cgccagagcugcuccucaucugcggggcgggggggggccgucgccgcguggggucguug

实施例 7：距离靶向碱基 3'端的长度对编辑效率的影响

在实施例 6 中，在 81nt: 55-c-25、71nt: 55-c-15 序列上检测到了较高的 IDUA 酶活性和编辑效率。为找到最短且最优的 3'端的长度，对 3'端从距离 5 靶向碱基的 25nt 开始（81nt: 55-c-25）到 10nt（66nt: 55nt-c-10nt）之间的序列进行逐个截短，如表 6 所示。最终通过 IDUA 酶活测定筛选出靶向碱基距离 3'端的最优长度为 24nt-11nt，如图 7A 所示。此外，通过比较可见 80nt: 55nt-c-24nt（SEQ ID NO: 22）、79nt: 55nt-c-23nt（SEQ ID NO: 23）、72nt: 55nt-c-16nt（SEQ ID NO: 30）、70nt: 55nt-c-14nt（SEQ ID NO: 31）、67nt: 10 55nt-c-11nt（SEQ ID NO: 34）可导致与 SEQ ID NO: 14 及 SEQ ID NO: 15 类似或更高的 IDUA 酶活性。

除此之外我们还在靶向鼠的 IDUA 突变位点（与人 IDUA- W402X 突变相对应的突变位点）的 arRNA 进行了靶向碱基距离 3'端最优长度的筛选，arRNA 的 3'距离靶向碱基的长度从 55nt 开始，每 5 个碱基截短一次，如表 7 15 所示。通过 IDUA 酶活性的测定筛选出小鼠中靶向碱基距离 3'端的长度为 55nt-10nt，最优长度为 55nt-10nt，如图 7B 所示。其中，111nt: 55nt-c-50nt（SEQ ID NO: 44）和 66nt: 55nt-c-10nt（SEQ ID NO: 52）表现出较为优异的编辑效率。

表 6:

55nt-c-25nt	SEQ ID NO 14:
-------------	---------------

	gacgcccaccgugugguugcuguccaggacggucccgccugcgacacuucggcccagagcugcuccu caucugcggggcg
55nt-c-24nt	SEQ ID NO 22: gacgcccaccgugugguugcuguccaggacggucccgccugcgacacuucggcccagagcugcuccu caucugcggggc
55nt-c-23nt	SEQ ID NO 23: gacgcccaccgugugguugcuguccaggacggucccgccugcgacacuucggcccagagcugcuccu caucugcgggg
55nt-c-22nt	SEQ ID NO 24: gacgcccaccgugugguugcuguccaggacggucccgccugcgacacuucggcccagagcugcuccu caucugcggg
55nt-c-21nt	SEQ ID NO 25: gacgcccaccgugugguugcuguccaggacggucccgccugcgacacuucggcccagagcugcuccu caucugcgg
55nt-c-20nt	SEQ ID NO 26: gacgcccaccgugugguugcuguccaggacggucccgccugcgacacuucggcccagagcugcuccu caucugcg
55nt-c-19nt	SEQ ID NO 27: gacgcccaccgugugguugcuguccaggacggucccgccugcgacacuucggcccagagcugcuccu caucugc
55nt-c-18nt	SEQ ID NO 28: gacgcccaccgugugguugcuguccaggacggucccgccugcgacacuucggcccagagcugcuccu caucug
55nt-c-17nt	SEQ ID NO 29: gacgcccaccgugugguugcuguccaggacggucccgccugcgacacuucggcccagagcugcuccu caucu
55nt-c-16nt	SEQ ID NO 30: gacgcccaccgugugguugcuguccaggacggucccgccugcgacacuucggcccagagcugcuccu cauc
55nt-c-15nt	SEQ ID NO: 15:

	gacgccaccgugugguugcuguccaggacggucccgccugcgacacuucggcccagagcugcuccu cau
55nt-c-14nt	SEQ ID NO 31: gacgccaccgugugguugcuguccaggacggucccgccugcgacacuucggcccagagcugcuccu ca
55nt-c-13nt	SEQ ID NO 32: gacgccaccgugugguugcuguccaggacggucccgccugcgacacuucggcccagagcugcuccu c
55nt-c-12nt	SEQ ID NO 33: gacgccaccgugugguugcuguccaggacggucccgccugcgacacuucggcccagagcugcuccu
55nt-c-11nt	SEQ ID NO 34: gacgccaccgugugguugcuguccaggacggucccgccugcgacacuucggcccagagcugcucc
55nt-c-10nt	SEQ ID NO 35: gacgccaccgugugguugcuguccaggacggucccgccugcgacacuucggcccagagcugcuc

表 7:

小鼠 arRNA	55nt-c-55nt	GacaccacUgUaUgaUUgcUgUccaacacagccccagccUUUgagaccUcUgccc agagUUgUUcUccaUcUaUaagccaagcagagggcUgaggcUgUUggcUcUcUc a (SEQ ID NO: 62)
	55nt-c-50nt	GacaccacUgUaUgaUUgcUgUccaacacagccccagccUUUgagaccUcUgccc agagUUgUUcUccaUcUaUaagccaagcagagggcUgaggcUgUUggcUc (SEQ ID NO: 44)
	55nt-c-45nt	GacaccacUgUaUgaUUgcUgUccaacacagccccagccUUUgagaccUcUgccc agagUUgUUcUccaUcUaUaagccaagcagagggcUgaggcUgUU (SEQ ID NO: 45)
	55nt-c-40nt	GacaccacUgUaUgaUUgcUgUccaacacagccccagccUUUgagaccUcUgccc agagUUgUUcUccaUcUaUaagccaagcagagggcUgagg (SEQ ID NO: 46)
	55nt-c-35nt	gacaccacUgUaUgaUUgcUgUccaacacagccccagccUUUgagaccUcUgccc agagUUgUUcUccaUcUaUaagccaagcagagggc (SEQ ID NO: 47)
	55nt-c-30nt	gacaccacUgUaUgaUUgcUgUccaacacagccccagccUUUgagaccUcUgccc agagUUgUUcUccaUcUaUaagccaagcag (SEQ ID NO: 48)

	55nt-c-25nt	gacacccacUgUaUgaUUgcUgUccaacacagccccagccUUUgagaccUcUgccc agagUUgUUcUccaUcUaUaagcca (SEQ ID NO: 49)
	55nt-c-20nt	gacacccacUgUaUgaUUgcUgUccaacacagccccagccUUUgagaccUcUgccc agagUUgUUcUccaUcUaUa (SEQ ID NO: 50)
	55nt-c-15nt	gacacccacUgUaUgaUUgcUgUccaacacagccccagccUUUgagaccUcUgccc agagUUgUUcUccaU (SEQ ID NO: 51)
	55nt-c-10nt	gacacccacUgUaUgaUUgcUgUccaacacagccccagccUUUgagaccUcUgccc agagUUgUUc (SEQ ID NO: 52)

实施例 8： 5'端长度对编辑效率的影响

我们选取了 2 个不同长度的 arRNA：76nt：55-c-20、71nt：55-c-15，在 3'端长度固定不变的基础上，5'端逐渐截短，如表 8 所示。通过 IDUA 酶活性实验测定当 5'端长度在 55nt—45nt 之间时，利用 arRNA 编辑后的细胞的 IDUA 酶活性较高，同时 arRNA 总长度在 65nt—61nt 之间 IDUA 酶活性有一个显著下降，如图 8A 所示。当 3'端的长度固定在 14nt 时，5'端长度从 51nt(即总长度 66nt)开始逐个碱基截短，当 5'端长度从 51nt 截短到 50nt(即总长度为 65nt)时，IDUA 酶活性出现了显著下降，因此 5'端的 arRNA 的截短要求总 arRNA 长度不能低于 66nt,如图 8B 所示。

表 8：

55nt-c-20nt	SEQ ID NO 26: gacgccaccgugugguugcuguccaggacgguccggccugcgacacuucggcccagagcugcuccucaucugcg
50nt-c-20nt	SEQ ID NO 36: ccaccgugugguugcuguccaggacgguccggccugcgacacuucggcccagagcugcuccucaucugcg
45nt-c-20nt	SEQ ID NO 37: gugugguugcuguccaggacgguccggccugcgacacuucggcccagagcugcuccucaucugcg
40nt-c-20nt	SEQ ID NO 38: guugcuguccaggacgguccggccugcgacacuucggcccagagcugcuccucaucugcg
35nt-c-20nt	SEQ ID NO 39: uguccaggacgguccggccugcgacacuucggcccagagcugcuccucaucugcg
55nt-c-15nt	SEQ ID NO: 15: gacgccaccgugugguugcuguccaggacgguccggccugcgacacuucggcccagagcugcuccucau
50nt-c-15nt	SEQ ID NO 40:

	ccaccgugugguugcuguccaggacggucccgccugcgacacuucggcccagagcugcuccuau
45nt-c-15nt	SEQ ID NO 41: gugugguugcuguccaggacggucccgccugcgacacuucggcccagagcugcuccuau
40nt-c-15nt	SEQ ID NO 42: guugcuguccaggacggucccgccugcgacacuucggcccagagcugcuccuau
35nt-c-15nt	SEQ ID NO 43: uguccaggacggucccgccugcgacacuucggcccagagcugcuccuau
51nt-c-14nt	SEQ ID NO: 56: cccaccgugugguugcuguccaggacggucccgccugcgacacuucggcccagagcugcuccuca
50nt-c-14nt	SEQ ID NO: 57: ccaccgugugguugcuguccaggacggucccgccugcgacacuucggcccagagcugcuccuca
49nt-c-14nt	SEQ ID NO: 58: caccgugugguugcuguccaggacggucccgccugcgacacuucggcccagagcugcuccuca
48nt-c-14nt	SEQ ID NO: 59: accgugugguugcuguccaggacggucccgccugcgacacuucggcccagagcugcuccuca
47nt-c-14nt	SEQ ID NO: 60: ccgugugguugcuguccaggacggucccgccugcgacacuucggcccagagcugcuccuca
46nt-c-14nt	SEQ ID NO: 61: cgugugguugcuguccaggacggucccgccugcgacacuucggcccagagcugcuccuca

实施例 9: RNA 化学修饰对编辑效率的影响

RNA 合成时对 RNA 进行不同类型的化学修饰, 可以增加 RNA 的稳定性和减少脱靶的可能性。比较常见的对 RNA 进行的化学修饰有 2'-OMe 和硫代, 我们实验选取了 2 个不同长度的 arRNA: 71nt、76nt, 进行了 2 种化学修饰方式的不同组合, 如表 8 所示。具体修饰方式所表示的意义如下所示:

CM1: 序列前 3 个和后 3 个核苷酸分别被 2'-OMe 修饰, 前 3 个和后 3 个核苷酸间连接均为硫代磷酸酯键连接; 同时序列中全部 U 均被 2'-OMe 修饰。

CM2: 序列前 3 个和后 3 个核苷酸分别被 2'-OMe 修饰, 前 3 个和后 3 个核苷酸间连接均为硫代磷酸酯键连接; 同时靶向碱基的 3' 最近邻碱基为 2'-OMe 修饰的 A。

CM3: 序列前 3 个和后 3 个核苷酸分别被 2'-OMe 修饰, 前 3 个和后 3 个核苷酸间连接均为硫代磷酸酯键连接; 同时靶向碱基的 5' 最近邻碱基为 2'-OMe 修饰的 C。

CM4: 序列前 3 个和后 3 个核苷酸分别被 2'-OMe 修饰, 前 3 个和后 3 个核苷酸间连接均为硫代磷酸酯键连接; 同时靶向碱基与其 3' 最近邻碱基和 5' 最近邻碱基分别以硫代磷酸酯键连接。

CM5: 除靶向碱基及与 5' 端与其邻近的 5 个碱基以及 3' 端与其最邻近的 5 个碱基之外, 所有核苷酸均被 2'-OMe 修饰; 同时序列前 3 个和后 3 个核苷酸间连接均为硫代磷酸酯键连接。

CM6: 序列前 5 个和后 5 个核苷酸分别被 2'-OMe 修饰, 并且前 5 个和后 5 个核苷酸间连接为硫代磷酸酯键连接。

在 GM06214 细胞中转染不同的 arRNA 对细胞内 IDUA 进行编辑, 收集转染后 48 小时的细胞进行 IDUA 酶活性测定, 从实验结果上看, 除 CM5(第 5 种修饰: 全部 2'-OMe, 除靶向碱基附近 11nt)其余几种修饰组合均具体较好的酶活性, 如图 9 所示。

表 9

名称	长度	修饰方式	序列
HIV2-7 6-CM1	55nt-c-2 0nt	CM1	Gm*Am*Cm*Gro-Cro-Cro-Cro-Aro-Cro-Cro-Gro-Umo-Gro-Umo-Gro-Gro-Umo-Umo-Gro-Cro-Umo-Gro-Umo-Cro-Cro-Aro-Gro-Gro-Aro-Cro-Gro-Gro-Umo-Cro-Cro-Cro-Gro-Gro-Cro-Umo-Gro-Cro-Gro-Aro-Cro-Aro-Cro-Umo-Umo-Cro-Gro-Gro-Cro-Cro-Aro-Gro-Aro-Gro-Cro-Umo-Gro-Cro-Umo-Cro-Cro-Umo-Cro-Aro-Umo-Cro-Um*Gm*Cm*Gm (SEQ ID NO 26)
HIV2-7 6-CM2	55nt-c-2 0nt	CM2:	Gm*Am*Cm*Gro-Cro-Cro-Cro-Aro-Cro-Cro-Gro-Umo-Gro-Umo-Gro-Gro-Umo-Umo-Gro-Cro-Umo-Gro-Umo-Cro-Cro-Aro-Gro-Gro-Aro-Cro-Gro-Gro-Umo-Cro-Cro-Cro-Gro-Gro-Cro-Umo-Gro-Cro-Gro-Aro-Cro-Aro-Cro-Umo-Umo-Cro-Gro-Gro-Cro-Cro-Cro-Aro-Gro-Aro-Gro-Cro-Umo-Gro-Cro-Umo-Cro-Cro-Umo-Cro-Aro-Umo-Cro-Um*Gm*Cm*Gm (SEQ ID NO 26)
HIV2-7 6-CM3	55nt-c-2 0nt	CM3:	Gm*Am*Cm*Gro-Cro-Cro-Cro-Aro-Cro-Cro-Gro-Umo-Gro-Umo-Gro-Gro-Umo-Umo-Gro-Cro-Umo-Gro-Umo-Cro-Cro-Aro-Gro-Gro-Aro-Cro-Gro-Gro-Umo-Cro-Cro-Cro-Gro-Gro-Cro-Umo-Gro-Cro-Gro-Aro-Cro-Aro-Cro-Umo-Umo-Cro-Gro-Gro-Cro-Cmo-Cro-Aro-Gro-Aro-Gro-Cro-Umo-Gro-Cro-Umo-Cro-Cro-Umo-Cro-Aro-Umo-Cro-Um*Gm*Cm*Gm (SEQ ID NO 26)
HIV2-7 6-CM4	55nt-c-2 0nt	CM4:	Gm*Am*Cm*Gro-Cro-Cro-Cro-Aro-Cro-Cro-Gro-Umo-Gro-Umo-Gro-Gro-Umo-Umo-Gro-Cro-Umo-Gro-Umo-Cro-Cro-Aro-Gro-Gro-Aro-Cro-Gro-Gro-Umo-Cro-Cro-C

			ro-Gro-Gro-Cro-Cro-Umo-Gro-Cro-Gro-Aro-Cro-Aro-Cr o-Umo-Umo-Cro-Gro-Gro-Cro-Cr*Cr*Ar-Gro-Aro-Gro- Cro-Umo-Gro-Cro-Umo-Cro-Cro-Umo-Cro-Aro-Umo-Cr o-Um*Gm*Cm*Gm (SEQ ID NO 26)
HIV2-7 6-CM5	55nt-c-2 0nt	CM5:	Gm*Am*Cm*Gmo-Cmo-Cmo-Cmo-Amo-Cmo-Cmo-Gm o-Umo-Gmo-Umo-Gmo-Gmo-Umo-Umo-Gmo-Cmo-Um o-Gmo-Umo-Cmo-Cmo-Amo-Gmo-Gmo-Amo-Cmo-Gm o-Gmo-Umo-Cmo-Cmo-Cmo-Gmo-Gmo-Cmo-Cmo-Umo -Gmo-Cmo-Gmo-Amo-Cmo-Amo-Cmo-Umo-Umo-Cro- Gro-Gro-Cro-Cro-Cro-Aro-Gro-Aro-Gro-Cro-Umo-Gmo- Cmo-Umo-Cmo-Cmo-Umo-Cmo-Amo-Umo-Cmo-Um*G m*Cm*Gm (SEQ ID NO 26)
HIV2-7 6-CM6	55nt-c-2 0nt	CM6:	Gm*Am*Cm*Gm*Cm*Cro-Cro-Aro-Cro-Cro-Gro-Uro- Gro-Uro-Gro-Gro-Uro-Uro-Gro-Cro-Uro-Gro-Uro-Cr o-Aro-Gro-Gro-Aro-Cro-Gro-Gro-Uro-Cro-Cro-Cro- Gro-Cro-Cro-Uro-Gro-Cro-Gro-Aro-Cro-Aro-Cro-Uro- Uro-Cro-Gro-Gro-Cro-Cro-Cro-Aro-Gro-Aro-Gro-Cro- Uro-Gro-Cro-Uro-Cro-Cro-Uro-Cro-Aro-Ur*Cm*Um*Gm*C m*Gm (SEQ ID NO 26)
HIV2-7 1-CM1	55nt-c-1 5nt	CM1:	Gm*Am*Cm*Gro-Cro-Cro-Cro-Aro-Cro-Cro-Gro-Umo- Gro-Umo-Gro-Gro-Umo-Umo-Gro-Cro-Umo-Gro-Umo- Cro-Cro-Aro-Gro-Gro-Aro-Cro-Gro-Gro-Umo-Cro-Cro- Cro-Gro-Gro-Cro-Cro-Umo-Gro-Cro-Gro-Aro-Cro-Aro-Cr o-Umo-Umo-Cro-Gro-Gro-Cro-Cro-Cro-Aro-Gro-Aro-Gr o-Cro-Umo-Gro-Cro-Umo-Cro-Cro-Um*Cm*Am*Um (SEQ ID NO: 15)
HIV2-7 1-CM2	55nt-c-1 5nt	CM2:	Gm*Am*Cm*Gro-Cro-Cro-Cro-Aro-Cro-Cro-Gro-Umo- Gro-Umo-Gro-Gro-Umo-Umo-Gro-Cro-Umo-Gro-Umo- Cro-Cro-Aro-Gro-Gro-Aro-Cro-Gro-Gro-Umo-Cro-Cro- Cro-Gro-Gro-Cro-Cro-Umo-Gro-Cro-Gro-Aro-Cro-Aro-Cr o-Umo-Umo-Cro-Gro-Gro-Cro-Cro-Cro-Amo-Gro-Aro-G ro-Cro-Umo-Gro-Cro-Umo-Cro-Cro-Um*Cm*Am*Um
HIV2-7 1-CM3	55nt-c-1 5nt	CM3:	Gm*Am*Cm*Gro-Cro-Cro-Cro-Aro-Cro-Cro-Gro-Umo- Gro-Umo-Gro-Gro-Umo-Umo-Gro-Cro-Umo-Gro-Umo- Cro-Cro-Aro-Gro-Gro-Aro-Cro-Gro-Gro-Umo-Cro-Cro- Cro-Gro-Gro-Cro-Cro-Umo-Gro-Cro-Gro-Aro-Cro-Aro-Cr o-Umo-Umo-Cro-Gro-Gro-Cro-Cmo-Cro-Aro-Gro-Aro-G ro-Cro-Umo-Gro-Cro-Umo-Cro-Cro-Um*Cm*Am*Um (SEQ ID NO: 15)
HIV2-7 1-CM4	55nt-c-1 5nt	CM4:	Gm*Am*Cm*Gro-Cro-Cro-Cro-Aro-Cro-Cro-Gro-Umo- Gro-Umo-Gro-Gro-Umo-Umo-Gro-Cro-Umo-Gro-Umo- Cro-Cro-Aro-Gro-Gro-Aro-Cro-Gro-Gro-Umo-Cro-Cro- Cro-Gro-Gro-Cro-Cro-Umo-Gro-Cro-Gro-Aro-Cro-Aro-Cr o-Umo-Umo-Cro-Gro-Gro-Cro-Cr*Cr*Ar-Gro-Aro-Gro- Cro-Umo-Gro-Cro-Umo-Cro-Cro-Um*Cm*Am*Um

			(SEQ ID NO: 15)
HIV2-7 1-CM5	55nt-c-1 5nt	CM5:	Gm*Am*Cm*Gmo-Cmo-Cmo-Cmo-Amo-Cmo-Cmo-Gm o-Umo-Gmo-Umo-Gmo-Gmo-Umo-Umo-Gmo-Cmo-Um o-Gmo-Umo-Cmo-Cmo-Amo-Gmo-Gmo-Amo-Cmo-Gm o-Gmo-Umo-Cmo-Cmo-Cmo-Gmo-Gmo-Cmo-Cmo-Umo -Gmo-Cmo-Gmo-Amo-Cmo-Amo-Cmo-Umo-Umo-Cro- Gro-Gro-Cro-Cro-Cro-Aro-Gro-Aro-Gro-Cro-Umo-Gmo- Cmo-Umo-Cmo-Cmo-Um*Cm*Am*Um (SEQ ID NO: 15)
HIV2-7 1-CM6	55nt-c-1 5nt	CM6:	Gm*Am*Cm*Gm*Cm*Cro-Cro-Aro-Cro-Cro-Gro-Uro- Gro-Uro-Gro-Gro-Uro-Uro-Gro-Cro-Uro-Gro-Uro-Cr o-Aro-Gro-Gro-Aro-Cro-Gro-Gro-Uro-Cro-Cro-Cro-Gro- Gro-Cro-Cro-Uro-Gro-Cro-Gro-Aro-Cro-Aro-Cro-Uro-Ur o-Cro-Gro-Gro-Cro-Cro-Cro-Aro-Gro-Aro-Gro-Cro-Uro- Gro-Cro-Uro-Cro*Cm*Um*Cm*Am*Um (SEQ ID NO: 15)

注：ro 代表核苷酸上不做修饰核和核苷酸之间连接酯键不修饰；r*代表核苷酸上不做修饰核和核苷酸之间用硫代磷酸酯键连接；mo 代表核苷酸做 2'-OMe 修饰核苷酸之间连接酯键不修饰；m*代表核苷酸做 2'-OMe 修饰核苷酸之间用硫代磷酸酯键连接。

5 实施例 10：化学修饰对编辑效率的影响

本实施例涉及靶向人 IDUA 的突变位点的 3 个优选 arRNA 和靶向小鼠 IDUA 突变位点 1 个优选 arRNA，应用 CM1 方式的化学修饰方法，在 GM06214 细胞和 MSPI MEF(MSPI 小鼠胚胎成纤维细胞(MSPI mouse embryo fibroblast, MEF)，分离自 IDUA 纯合突变的胎鼠(idua W392X 小鼠，B6.129S-Idua^{tml1.1Kmkc/J})(Wang D, Shukla C, Liu X, et al. Characterization of an MPS I-H knock-in mouse that carries a nonsense mutation analogous to the human IDUA-W402X mutation [published correction appears in Mol Genet Metab. 2010 Apr;99(4):439]. Mol Genet Metab. 2010;99(1):62-71. doi:10.1016/j.ymgme.2009.08.002))细胞上进行浓度梯度实验。

15 从实施例 7 的实验结果中，我们选取了 3 个靶向人 IDUA 的 arRNA，长度分别是：55nt-c-16nt, 55nt-c-14nt, 55nt-c-11nt, 1 个靶向小鼠 IDUA 的 arRNA：55nt-c-10nt。此外，我们还选取了随机 arRNA 序列 RM-67CM1 作为对照。从实施例 9 中我们选取了 CM1（全部 u：2'-OMe）的化学修饰方式合成了上述靶向 IDUA 的 arRNA，如表 9 所示。我们在人 GM06214 细胞和

MSPI 小鼠 MEF 相比上进行了 arRNA 浓度梯度的转染。arRNA 浓度为：160nM，80nM，40nM，20nM，10nM，5nM，2.5nM，1.25nM，0.625nM 共 9 个浓度。细胞铺在 6 孔板中，铺板后 24hrs 进行转染，转染后 48hrs 消化细胞，取一半细胞进行 IDUA 酶活性检测，一半细胞提 RNA 进行编辑效率检测。酶活性检测的结果显示 arRNA 的转染浓度在大于等于 2.5-5nM 时，便能达到一个较高的酶活，而在大于等于 10-20nM 时其酶活达到平台期，如图 10A 和 10C 所示，同时相同浓度的 arRNA 转染在人细胞（GM06214）和小鼠细胞（MSPI MEF）中所产生的 IDUA 酶活性和编辑效率不同，如图 10B 和 10D 所示。

表 10:

名称和长度	修饰方式	序列
55nt-c-11nt CM1	CM1	`-Gm*Am*Cm*Gro-Cro-Cro-Cro-Aro-Cro-Cro-Gro-Umo-Gro-Umo -Gro-Gro-Umo-Umo-Gro-Cro-Umo-Gro-Umo-Cro-Cro-Aro-Gro-Gr o-Aro-Cro-Gro-Gro-Umo-Cro-Cro-Cro-Gro-Gro-Cro-Cro-Umo-Gro -Cro-Gro-Aro-Cro-Aro-Cro-Umo-Umo-Cro-Gro-Gro-Cro-Cro-Cro- Aro-Gro-Aro-Gro-Cro-Umo-Gro-Cr*Um*Cm*Cm (SEQ ID NO: 34)
55nt-c-16ntCM1	CM1	`-Gm*Am*Cm*Gro-Cro-Cro-Cro-Aro-Cro-Cro-Gro-Umo-Gro-Umo -Gro-Gro-Umo-Umo-Gro-Cro-Umo-Gro-Umo-Cro-Cro-Aro-Gro-Gr o-Aro-Cro-Gro-Gro-Umo-Cro-Cro-Cro-Gro-Gro-Cro-Cro-Umo-Gro -Cro-Gro-Aro-Cro-Aro-Cro-Umo-Umo-Cro-Gro-Gro-Cro-Cro-Cro- Aro-Gro-Aro-Gro-Cro-Umo-Gro-Cro-Umo-Cro-Cr*Um*Cm*Am (SEQ ID NO: 30)
55nt-c-14ntCM1	CM1	`-Gm*Am*Cm*Gro-Cro-Cro-Cro-Aro-Cro-Cro-Gro-Umo-Gro-Umo -Gro-Gro-Umo-Umo-Gro-Cro-Umo-Gro-Umo-Cro-Cro-Aro-Gro-Gr o-Aro-Cro-Gro-Gro-Umo-Cro-Cro-Cro-Gro-Gro-Cro-Cro-Umo-Gro -Cro-Gro-Aro-Cro-Aro-Cro-Umo-Umo-Cro-Gro-Gro-Cro-Cro-Cro- Aro-Gro-Aro-Gro-Cro-Umo-Gro-Cro-Umo-Cro-Cro-Umo-Cr*Am* Um*Cm (SEQ ID NO: 31)

随机 RNA--67ntCM1	CM1	`-Um*Am*Cm*Cro-Gro-Cro-Umo-Aro-Cro-Aro-Gro-Cro-Cro-Aro- Cro-Gro-Cro-Umo-Gro-Aro-Umo-Umo-Umo-Cro-Aro-Gro-Cro-Um o-Aro-Umo-Aro-Cro-Cro-Umo-Gro-Cro-Cro-Cro-Gro-Gro-Umo-Ar o-Umo-Aro-Aro-Aro-Gro-Gro-Gro-Aro-Cro-Gro-Umo-Umo-Cro-Ar o-Cro-Aro-Cro-Cro-Gro-Cro-Gr*Am*Um*Gm (SEQ ID NO: 53)
小鼠: 55nt-c-10ntCM1	CM1	Gm*Am*Cm*Aro-Cro-Cro-Cro-Aro-Cro-Umo-Gro-Umo-Aro-Umo -Gro-Aro-Umo-Umo-Gro-Cro-Umo-Gro-Umo-Cro-Cro-Aro-Aro-Cr o-Aro-Cro-Aro-Gro-Cro-Cro-Cro-Cro-Aro-Gro-Cro-Cro-Umo-Umo -Umo-Gro-Aro-Gro-Aro-Cro-Cro-Umo-Cro-Umo-Gro-Cro-Cro-Cro -Aro-Gro-Aro-Gro-Umo-Umo-Gr*Um*Um*Cmo (SEQ ID NO: 52)

注： ro 代表核苷酸上不做修饰和核苷酸之间连接酯键不修饰；r*代表核苷酸上不做修饰和核苷酸之间用硫代磷酸酯键连接;mo 代表核苷酸做 2'-OMe 修饰核苷酸之间连接不修饰；m*代表核苷酸做 2'-OMe 修饰核苷酸之间用硫代磷酸酯键连接。

5 实施例 11：通过 arRNA 编辑后 IDUA 可持续保持蛋白酶活性

本实验通过使用靶向人 IDUA 的突变位点的 3 个优选 arRNA 和靶向小鼠 IDUA 突变位点 1 个优选 arRNA，并对其进行 CM1 方式的化学修饰，在 GM06214 细胞和 MSPI MEF(mouse embryo fibroblast)细胞上获得显著提高的 IDUA 酶活性，并且可持续约 3 周以上。

- 10 在实施例 10 中我们进行了人和小鼠中优选出的靶向 IDUA 的 arRNA 转染后 48hrs 在不同浓度下的比较，此实施例中我们选取 20nM 的浓度在不同时间通过 IDUA 酶活性和编辑效率进行比较。如图 11A 所示，arRNA 转染 GM06214 细胞后我们连续检测了 14 天的 IDUA 酶活，转染后酶活的高峰为第 4 天到第 9 天，第 14 天酶活性仍高于第 2 天，随后我们又在更长的时间
- 15 点上检测了 2 天分别是转染后第 17 天和 21 天，从 10A 图上可以看到第 21 天的酶活仍高于转染后第 1 天，酶活约为 GM01323 的 6 到 10 倍。(编辑效率待补充，图 11B)。在 MSPI MEF 细胞中 arRNA 转染后我们连续检测了 8 天 IDUA 酶活性，由图 11C 中可以看到，arRNA 转染后 24hrs 开始酶活性约

为 GM1323 细胞的 2 倍直至第 8 天，从图 11D 的编辑效率检测中可以看到，IDUA 的编辑效率高峰为 24hrs，而后持续下降。

通过人和小鼠数据的比较我们发现，arRNA 在小鼠中的编辑高峰是转染后 24hrs，而人中是 48hrs，编辑后 IDUA 蛋白酶活性的持续时间在人的细胞
5 中大于 21 天，在小鼠中大于 8 天。

实施例 12：arRNA 递送方式对编辑效率的影响

本实验涉及在原代培养的人和小鼠的肝脏细胞上利用 LEAPER 技术对野生型的 PPIB 基因位点进行编辑，通过不同的方式进行 arRNA 递送，筛选
10 出最优的递送方式。

“PPIB”是指人 NM_000942 (PPIB Genomic chr15 (-): 64163082) UTR 区域野生位点或小鼠 NM_011149 (PPIB Genomic chr9 (+): 66066490) UTR 区域野生位点。其可以是成熟的 mRNA 也可以是 mRNA 前体。PPIB 的 UTR 区段存在一个 TAG，本实施例中将所述 TAG 中的 A 作为靶标进行编辑，以
15 测试本申请中的 arRNA 在肝脏细胞中的编辑效率。

我们设计并合成了靶向 PPIB UTR 区域的 arRNA (55nt-c-15nt)，如表 11 所示。合成的 arRNA 部分溶解分装后存于-80 度用于 Lipo (lipofectmine RNAiMAX)的转染，其余包装成 LNP。LNP 的包装参考文献中方法（参考文献：Witzigmann D, Kulkarni J A, Leung J, et al. Lipid nanoparticle technology
20 for therapeutic gene regulation in the liver[J]. Advanced Drug Delivery Reviews, 2020.; Kauffman K J, Dorkin J R, Yang J H, et al. Optimization of lipid nanoparticle formulations for mRNA delivery in vivo with fractional factorial and definitive screening designs[J]. Nano letters, 2015, 15(11): 7300-7306.; Reis J, Kanagaraj S, Fonseca A, et al. In vitro studies of multiwalled carbon
25 nanotube/ultrahigh molecular weight polyethylene nanocomposites with osteoblast-like MG63 cells[J]. Brazilian Journal of Medical and Biological Research, 2010, 43(5): 476-482.)。

人肝脏原代细胞购买于 LONZA(货号：HUCPI)，细胞按照厂家说明书复苏培养（复苏培养基货号：MCHT50；铺板培养基货号：MP100）。细
30 胞贴壁后更换为肝细胞维持培养基 5C(参考文献：Xiang C, Du Y, Meng G, et

al. Long-term functional maintenance of primary human hepatocytes in vitro[J]. Science, 2019, 364(6438): 399-402)。

小鼠肝脏原代细胞分离于 C57BJ 小鼠（参考文献：Charni-Natan M, Goldstein I. Protocol for Primary Mouse Hepatocyte Isolation[J]. STAR protocols, 2020, 1(2): 100086.）分离肝脏细胞贴壁后更换为维持培养基 5C。

人的肝脏细胞复苏后 24hrs 进行 arRNA 递送，LNP 和 Lipo 的递送浓度均为 20nM。小鼠肝脏细胞分离培养 24hrs 后进行 arRNA 递送，LNP 和 Lipo 的递送浓度均为 20nM。人和小鼠的肝脏细胞分别于 arRNA 递送后 24hrs 和 48hrs 收取 RNA，通过二代测序检测编辑效率。从图 12A 中可以看到，在人的肝脏细胞中，2 种方式的 arRNA 递送后 48hrs 编辑效率均高于 24hrs，同时 LNP 递送的 arRNA 产生的编辑效率在 24hrs 优于 Lipo 的递送，48hrs 两种递送方式编辑效率近似。从图 12B 中可以看到，在小鼠的肝脏细胞中，2 种方式的 arRNA 递送后 24hrs 编辑效率均高于 48hrs,同时 Lipo 递送 arRNA 产生的编辑效率在 24hrs 和 48hrs 均高于同时间 LNP 的递送。

因此，通过肝脏原代细胞中 PPIB 位点编辑效率的比较，我们可以得出小鼠肝脏细胞中编辑的高峰位于 arRNA 递送后 24hrs，而人的肝细胞中编辑高峰位于 48hrs,这与在人的 GM06214 细胞和小鼠的 MSPI MEF 细胞中的数据一致。人肝脏细胞中 arRNA 的递送，LNP 优于或等于 Lipo 的递送。小鼠的肝脏细胞中 arRNA 的递送，Lipo 远优于 LNP 的递送。

表 11：

小鼠	CACCCCAUCAGAUUGGAAGCACUAGGGCCAGGGUGGCACAGAACCUUGUGACU
55nt-c-15nt	GGCCACCUUCGUCUGUGUG (SEQ ID NO: 54)
人	GGAGGCGAAAGCAGCCCGGACAGCUGAGGCCGGAAGAGGGUGGGGCCCGCGGU
55nt-c-15nt	GGCCAGGGAGCCGGCGCCG (SEQ ID NO: 55)

实施例 13：LNP 递送的编辑效率

本实验涉及在原代培养的人和小鼠的肝脏细胞上利用 LNP 递送 IDUA 的 arRNA 对 IDUA 的编辑效率的研究。

我们设计并合成了靶向人 IDUA CDS 区域野生位点的 arRNA,如表 12 所示。将人和小鼠的 arRNA（20nM）分别通过 LNP 递送至人原代肝脏细胞和

小鼠原代肝脏细胞，递送后分别于 24 小时和 48 小时检测编辑效率，如图 13 所示。从图中我们可以看到在体外原代培养的肝脏细胞中 IDUA 的编辑效率中，人的 IDUA 在 48 小时编辑效率可以达到约 30%，小鼠中最高编辑效率出现在 24 小时约为 15%。进一步表明 LNP 可以在人的细胞中，尤其是人的

5 肝脏原代细胞中，达到更高的递送效率。

表 12

人 IDUA 55nt-c-15nt	GGAGGCGAAAGCAGCCCGGACAGCUGAGGCCGGAAGA GGGUGGGGGCCGCGGUGGCCAGGGAGCCGGCGCCG (SEQ ID NO: 55)
-----------------------	---

实施例 14：针对 MSPI 模型小鼠 IDUA 的 arRNA 的治疗作用

本实验使用的是 MPSI 模型小鼠 (idua W392X 小鼠, B6.129S-Idua^{tm1.1Kmke/J})

10 (Wang D, Shukla C, Liu X, et al. Characterization of an MPS I-H knock-in mouse that carries a nonsense mutation analogous to the human IDUA-W402X mutation [published correction appears in Mol Genet Metab. 2010 Apr;99(4):439]. Mol Genet Metab. 2010;99(1):62-71. doi:10.1016/j.ymgme.2009.08.002), 该突变与人 IDUA- W402X 突变相对应,

15 该突变可提前终止蛋白质合成，在 Hurler 黏多多糖症(MPS I-H)综合征患者中普遍存在。 α -1-iduronidase 酶的缺乏导致这种溶酶体储存疾病。5 周龄、10 周龄和 30 周龄纯合子小鼠的大脑和肝脏组织中均未检测到 α -1-iduronidase 活性。尽管这种突变纯合子的小鼠是有活力和可育的，但它们的平均寿命是 69 周。纯合子表现出尿中糖胺聚糖(GAGs)排泄量的进行性增加，

20 以及组织中 GAGs 的进行性积累。稳态 Idua mRNA 水平降低 30-50%。组织学分析显示浦肯野细胞、髓质神经元的胞质中溶酶体储存内含物的累进积累，以及随年龄增长而增加的泡沫状巨噬细胞浸润。x 线片显示髌骨弓和股骨增厚在 15 周龄时可见，35 周龄时增厚。35 周龄时，股骨骨密度增加，体脂百分比减少。我们将筛选出的靶向小鼠突变 IDUA 的 arRNA：

25 55nt-c-10ntCM1 (SEQ ID NO: 52), 包装成 LNP。将不同浓度的 arRNA 通过尾静脉进行注射，所述不同浓度分别为 0.1mg/kg; 0.5mg/kg; 2mg/kg; 10mg/kg。给药后 24hrs 取小鼠肝脏细胞进行 IDUA 编辑效率检测，如图 14

所示。给药后 24 小时可以在 10mg/kg 组检测到约 2% 的编辑效率。该实施例结果证明了针对 MSPI 模型小鼠 IDUA 的 arRNA 在体内可实现对肝脏细胞中突变 IDUA 基因的精准编辑，纠正 IDUA 突变，达到治疗 MPSI 的目的。