

<https://doi.org/10.25557/2073-7998.2023.02.3-17>

Применение антисмысловых молекул для коррекции нарушений сплайсинга в терапии наследственных заболеваний

Галушкин А.С., Некрасов А.Ю.

ФГБНУ «Медико-генетический научный центр им. акад. Н.П. Бочкова»
115522, г. Москва, ул. Москворечье, д.1

Сплайсинг – сложно регулируемый этап экспрессии генов, в котором задействованы множественные цис-элементы, представленные консенсусными последовательностями пре-мРНК, а также транс-элементы – белки и рибонуклеопротеиновые комплексы. Описано множество патогенных генетических вариантов, являющихся причиной нарушения сплайсинга, и ряд исследований направлен на создание эффективных способов их коррекции.

Последние работы, посвященные пониманию регуляции сплайсинга, позволили разработать несколько инструментов его коррекции для терапии наследственных заболеваний. В данном обзоре описан опыт применения конструкций на основе антисмысловых молекул *in vitro* и *in vivo*, учитывающих особенности механизма нарушения сплайсинга и задействованные элементы его регуляции, рассматриваются преимущества и недостатки применения с целью коррекции сплайсинга антисмысловых олигонуклеотидов, модифицированных малых ядерных рибонуклеопротеинов, системы модификации пре-мРНК на основе механизма транс-сплайсинга, а также способы их доставки в клетки с использованием вирусных векторов.

Ключевые слова: сплайсинг, генная терапия, антисмысловые олигонуклеотиды, мРНК.

Для цитирования: Галушкин А.С., Некрасов А.Ю. Применение антисмысловых молекул для коррекции нарушений сплайсинга в терапии наследственных заболеваний. *Медицинская генетика* 2023; 22(2): 3-17.

Автор для корреспонденции: Галушкин Артур Сергеевич; **e-mail:** arthurgaluschkin@gmail.com

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственного задания Минобрнауки России для ФГБНУ «МГНЦ».

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила: 10.02.2023

The use of antisense molecules for splicing modulation as a treatment for genetic disorders

Galushkin A.S., Nekrasov A.Yu.

Research Centre for Medical Genetics
1, Moskvorechye str., Moscow, 115522, Russian Federation

Splicing is a complex stage of gene expression regulated by many *cis*-elements represented by the specific pre-mRNA sequence motifs and *trans*-elements that are proteins and ribonucleoprotein complexes. Splicing disruption often leads to genetic disorders. A lot of pathogenic variants causing aberrant splicing are described in databases for human mutations, demonstrating a need for the development of the effective and safe splicing modulation tools and its application.

Recent studies of the fundamental splicing regulation processes allow researchers to develop few tools for splicing modulation in order to be used as a therapeutic. In this review we describe the experience in antisense molecules application *in vitro* and *in vivo* according to the pathogenesis of the splicing disruption and affected components of its regulation; advantages and disadvantages of antisense oligonucleotides, modified small nuclear RNAs, spliceosome-mediated mRNA *trans*-splicing technology as a tools of therapy and tools for its delivery to the cells are also discussed.

Key words: splicing, gene therapy, antisense oligonucleotides, snRNA.

For citation: Galushkin A.S., Nekrasov A.Yu. The use of antisense molecules for splicing modulation as a treatment for genetic disorders. *Medical genetics [Medicinskaya genetika]* 2023; 22(2): 3-17. (In Russ.)

Corresponding author: Artur S. Galushkin; **email:** arthurgaluschkin@gmail.com

Funding. The study was supported by the state task of the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation.

Conflict of interest. The authors declare no conflicts of interest.

Accepted: 10.02.2023

Введение

Одним из этапов экспрессии большинства генов высших эукариот является сплайсинг, в ходе которого из пре-мРНК удаляются некодирующие участки — интроны, а кодирующие — экзоны — последовательно сшиваются [1]. Регуляция сплайсинга осуществляется взаимодействием цис- и транс-регуляторных элементов, представленных консенсусными последовательностями самой пре-мРНК и рядом белков и рибонуклеопротеинов, формирующих комплекс сплайсосомы [2]. Цис-элементами пре-мРНК, необходимыми для регуляции сплайсинга, являются (рис. 1) [3]:

- точка ветвления — аденин, локализованный в участке от 18 до 40 нуклеотидов перед 3'-концом интрона;
- акцепторный сайт сплайсинга (3'-сайт сплайсинга), представленный консервативной последовательностью, в состав которой входят полипиримидиновый тракт, два нуклеотида AG на 3'-конце интрона (канонические динуклеотиды акцепторного сайта сплайсинга) и первые 3 нуклеотида экзона;
- мотивы экзонных и интронных энхансеров сплайсинга — последовательности, связывающиеся с белками-энхансерами сплайсинга (SR-белки), привлекающими элементы сплайсосомы к сайтам сплайсинга;
- мотивы экзонных и интронных сайленсеров сплайсинга — последовательности, связывающиеся с белками-репрессорами сплайсинга (hnRNP);
- донорный сайт сплайсинга (5'-сайт сплайсинга), представленный консервативной последовательностью: три последних нуклеотида экзона и шесть первых нуклеотидов интрона, в том числе канонические динуклеотиды донорного сайта сплайсинга на 5'-конце интрона GU.

Сплайсинг проходит несколько последовательных этапов и катализируется малыми ядерными рибонуклеопротеинами (мяРНП). Сначала происходит присоединение U1-мяРНП к 5'-концу интрона путём образования комплементарных связей между U1-мяРНП и нуклеотидной последовательностью донорного сайта сплайсинга. После этого последовательность интрона формирует петлю из-за гидрофильной атаки ОН-группы аденина точки ветвления на гуанин канонических динуклеотидов донорного сайта сплайсинга. Далее ОН-группа производит вторую гидрофильную атаку уже на фосфодиэфирную связь канонических динуклеотидов акцепторного сайта сплайсинга. Экзоны «сшиваются» друг с дру-

гом, образуя ковалентные связи, а сформированная в результате двух реакций переэтерификации петля удаляется вместе с катализировавшими данный процесс U2-, U5- и U6-мяРНП (рис. 1) [4].

Мутации, приводящие к нарушению сплайсинга, изменяют консервативную последовательность цис-элементов, что приводит к ухудшению или полному отсутствию их распознавая транс-элементами сплайсинга. Наиболее частыми последствиями нарушения сплайсинга являются пропуск экзона, использование альтернативных донорного (5'-сайт сплайсинга) или акцепторного (3'-сайт сплайсинга) сайтов сплайсинга внутри экзона или интрона с образованием укороченной или удлинённой изоформы белка, удержание интрона с включением его последовательности в состав зрелой мРНК и образованием удлинённой изоформы белка (рис. 1). Во многих случаях можно наблюдать их комбинацию [2]. Также необходимо учитывать, что изменение длины экзона вследствие нарушения сплайсинга может приводить к сдвигу рамки считывания, образованию преждевременного стоп-кодона и, как следствие, — нонсенс-опосредованному распаду мРНК [5].

В международной базе мутаций человека HGMD количество мутаций, влияющих на сплайсинг, составляет 30191 (версия 2021.4), что составляет 8,56% от общего количества зарегистрированных мутаций (352731). Однако предполагается, что количество патогенных вариантов, приводящих к нарушению сплайсинга, гораздо больше, ведь синонимичные, миссенс и нонсенс-варианты могут быть неверно классифицированы по причине отсутствия их функционального анализа, поэтому доля мутаций, влияющих на сплайсинг, оценивается исследователями примерно в 30% от общего количества [6], что создаёт необходимость в инструментах его коррекции, а также способах их доставки в клетки и ткани организма. На данный момент основные инструменты коррекции сплайсинга представлены как свободными антисмысловыми олигонуклеотидами, так и антисмысловыми олигонуклеотидами в составе различных конструкций, таких как модифицированные U1-мяРНП и U7-мяРНП, SMaRT-конструкции (spliceosomal-mediated RNA trans-splicing) [7], а также низкомолекулярными соединениями — SMC (Small Molecule Compounds) [6].

Коррекция сплайсинга является одним из перспективных направлений генной терапии. При использовании инструментов, модулирующих сплайсинг, целью является молекула пре-мРНК, таким об-

разом не происходит вмешательства в геном клетки. Известны несколько одобренных для применения терапевтических средств, механизм действия которых заключается именно в изменение молекулы пре-мРНК, например несколько препаратов на основе антисмысловых олигонуклеотидов для лечения спинальной мышечной атрофии, миодистрофии Дюшенна и т. д. Также на фоне успешных экспериментов *in vitro* проводятся активные исследования других инструментов коррекции сплайсинга с использованием вирусных векторов, позволяющих поддерживать экспрессию действующих молекул на протяжении длительного периода.

Модуляторы сплайсинга

Антисмысловые олигонуклеотиды

Антисмысловые олигонуклеотиды (АСО) – олигонуклеотиды длиной 15-25 оснований, обратные комплементарные таргетному участку пре-мРНК. Для предотвращения деградации РНКазой-Н, повышения стабильности *in vivo* и улучшения их поглощения клетками АСО химически модифицируют: заменяют фосфодиэфирные связи, модифицируют рибозный остов или азотистое основание [8]. Действие АСО направлено на «блокирование» интересующего регуляторного цис-элемента сплайсинга, делая его недоступным для

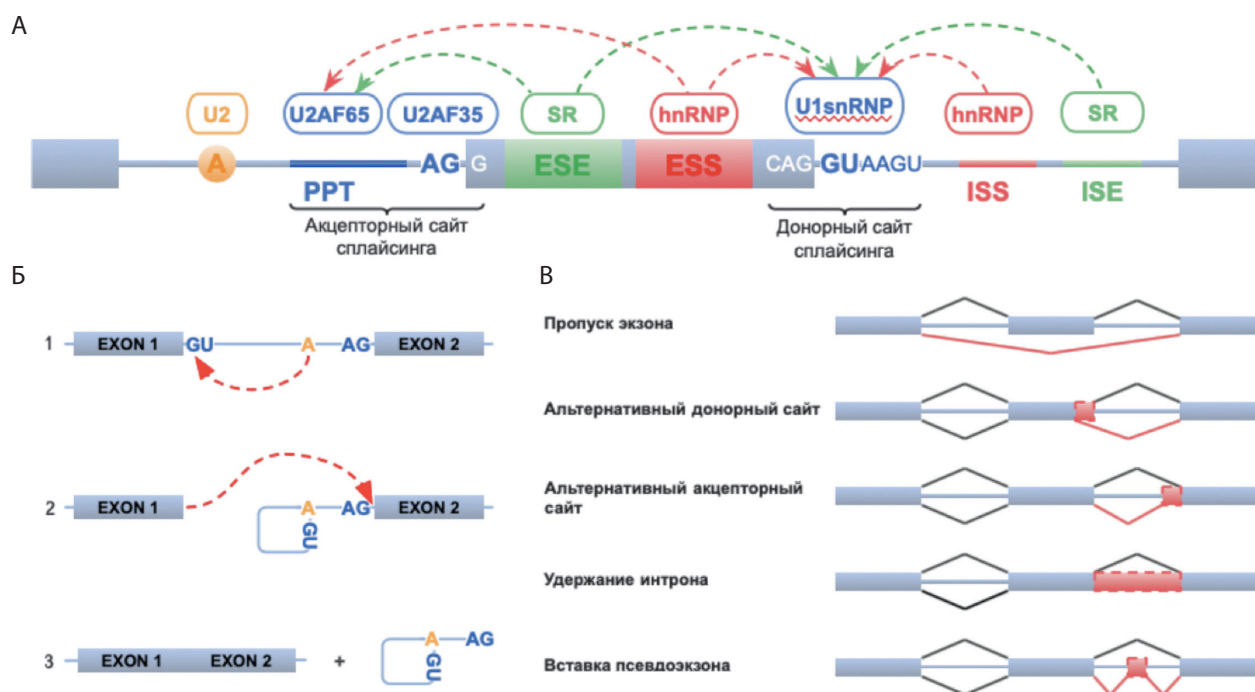


Рис. 1. Регуляция сплайсинга и различные исходы его нарушения. А. Цис- и транс-регуляторные элементы сплайсинга. А – точка ветвления; PPT – полипиримидиновый тракт; AG – канонические динуклеотиды акцепторного сайта сплайсинга; ESE – экзонный энхансер сплайсинга; ESS – экзонный сайленсер сплайсинга; GT – канонические динуклеотиды донорного сайта сплайсинга; ISS – интронный сайленсер сплайсинга; ISE – интронный энхансер сплайсинга; U2, U2AF65, U2AF35, SR, hnRNP, U1snRNP – регуляторные транс-элементы сплайсинга, белки и рибонуклеопротеиновые комплексы. Зелеными стрелками изображена стимуляция сплайсинга – привлечение транс-элементов к цис-элементам, красными – его подавление. Б. Процесс удаления последовательности интрона. В. Нарушения сплайсинга.

Fig. 1. Regulation of splicing and various outcomes of its errors. A. Cis- and trans-regulatory elements of splicing. A – branch point; PPT – polypyrimidine tract; AG – canonical dinucleotides of the acceptor splicing site; ESE – exon splicing enhancer; ESS – exon splicing silencer; GT – canonical dinucleotides of the donor splicing site; ISS – intron splicing silencer; ISE – intronic splicing enhancer; U2, U2AF65, U2AF35, SR, hnRNP, U1snRNP – regulatory trans splicing elements, proteins and ribonucleoprotein complexes. The green arrows show the stimulation of splicing – the attraction of trans elements to cis elements, the red arrows – its suppression. B. The process of removing the intron sequence. B. Splicing errors.

распознавания элементами сплайсосомы [6]. Важным свойством антисмысловых молекул является отсутствие влияния на геном напрямую, так как они взаимодействуют с пре-мРНК, что делает их применение в терапевтических целях более безопасным. К другим преимуществам АСО можно отнести их структурную стабильность, устойчивость к эндогенным РНКазам и низкую токсичность [8]. В настоящее время одобрено несколько лекарственных препаратов на основе АСО, механизм действия которых заключается в коррекции сплайсинга, например нусинерсен (спинальная мы-

шечная атрофия), этеплирсен (мышечная дистрофия Дюшенна), а также миласен, разработанный с целью коррекции нарушения сплайсинга лишь у одной пациентки с нейрональным цероидным липофусцинозом 7 типа (рис. 2).

Причиной спинальной мышечной атрофии (СМА) являются делеция экзона 7 и другие патогенные варианты в гене *SMN1*, приводящие к недостаточности белка SMN. Существует копия гена *SMN1* – ген *SMN2*, различия между ними заключаются лишь в одном нуклеotide, но это приводит к пропуску экзона 7 гена

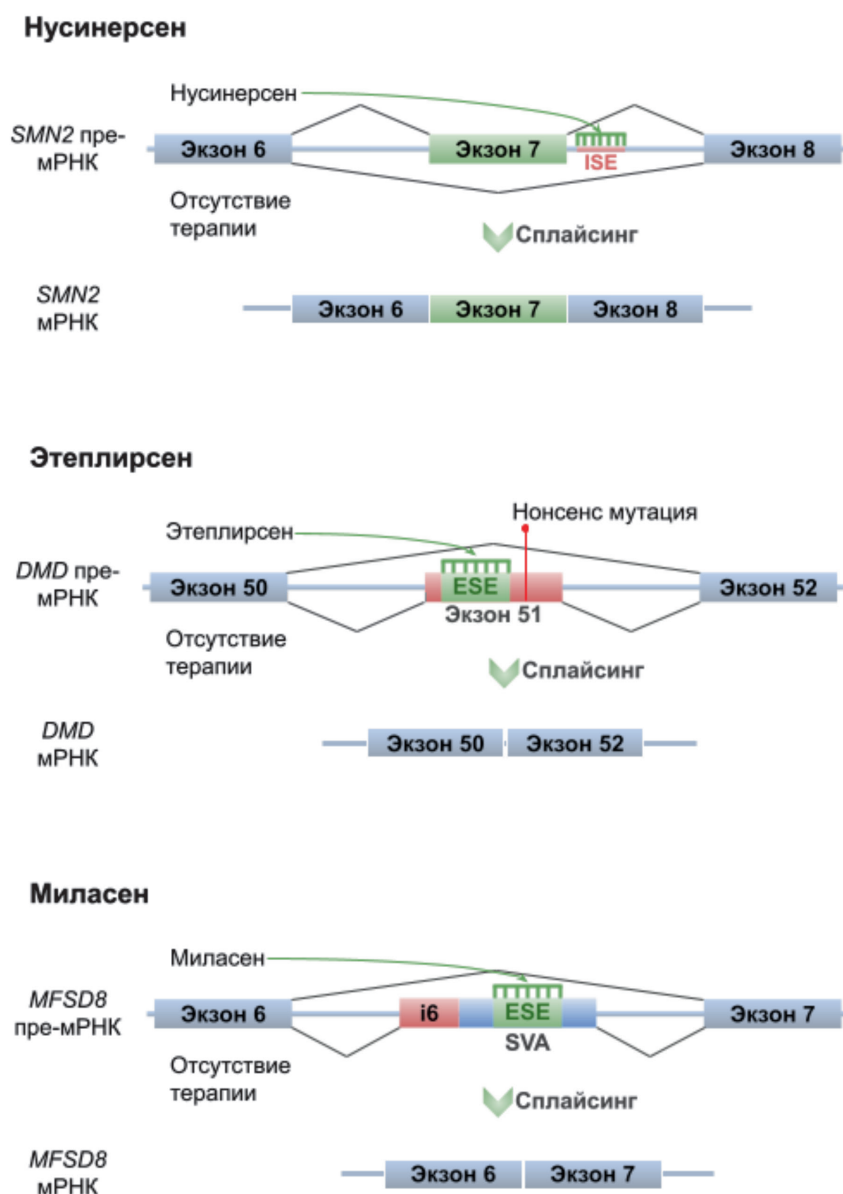


Рис. 2. Схематическое представление механизма действия препаратов на основе АСО. ISE – интронный сайленсер сплайсинга; ESE – экзонный энхансер сплайсинга; i6 – участок интрона 6 гена *MFSD8*; SVA (SINE, VNTR, Alu) – последовательность транспозона.

Fig. 2. Scheme of the mechanism of action of antisense oligonucleotides. ISE – intron splicing silencer; ESE – exon splicing enhancer; i6 – region of intron 6 of the *MFSD8* gene; SVA (SINE, VNTR, Alu) is the transposon sequence.

SMN2 на уровне мРНК, и в результате синтезируется небольшая часть функционального белка. Механизм действия нусинерсена (антисмысловая последовательность 5'-UCACUUUCAUAAUGCUGG-3') заключается в блокировании мотива сайленсера сплайсинга, локализованного в интроне 7 гена *SMN2*, и восстановлении включения экзона 7 в последовательность мРНК, компенсируя таким образом недостаточность белка (рис. 2) [9, 10].

Около 13% пациентов с диагностированной мышечной дистрофией Дюшенна имеют патогенные варианты в гене *DMD*, приводящие к сдвигу рамки считывания и образованию преждевременного стоп-кодона, например, нонсенс-мутация в экзоне 51 или делеция экзонов 48-50. Препарат этеплирсен (антисмысловая последовательность 5'-CUCCAACAUC AAGGAAGAUGGCAUUCUAG-3'), связываясь с мотивом экзонного энхансера сплайсинга и блокируя его взаимодействие с регуляторными транс-элементами сплайсинга, стимулирует пропуск экзона 51 на уровне мРНК, благодаря чему происходит восстановление открытой рамки считывания РНК (рис. 2). Аналогично действуют препараты голодирсен и вилтоларсен (пропуск экзона 53 гена *DMD*), касимерсен (пропуск экзона 45 гена *DMD*) [10, 11].

Миласен (антисмысловая последовательность 5'-AACUGUUAGUGCUUGUUGAGGGC-3') был разработан для пациентки с диагнозом нейронального цероидного липофусциноза 7 типа, у которой была обнаружена инсерция на уровне ДНК последовательности транспозона в интроне 6 гена *MFSD8*, приводящая к включению в последовательность мРНК участка, содержащего преждевременный стоп-кодон. Для блокирования активированного акцепторного сайта сплайсинга и энхансеров сплайсинга были разработаны АСО, химически модифицированные аналогично нусинерсену [12]. Наиболее эффективной оказалась молекула, блокирующая экзонный энхансер сплайсинга (рис. 2).

U-богатые мяРНП

U-богатые мяРНП представляют собой рибонуклеопротеиновые комплексы, большинство из которых (U1-, U2-, U4-, U5-, U6-мяРНП) являются субъединицами сплайсосомы, в составе которой они катализируют реакции, протекающие в ходе сплайсинга. Также существуют мяРНП, не участвующие в сплайсинге, например, U7-мяРНП, которая вовлечена в процессинг 3'-конца мРНК гистонов [13]. Рибонуклеиновая часть

мяРНП представлена различными некодирующими неполиаденированными транскриптами — мяРНК. Использование антисмысловых олигонуклеотидов в составе U-богатых мяРНП для коррекции нарушений сплайсинга имеет большую эффективность по сравнению с использованием свободных АСО за счет лучшего накопления данных конструкций в клеточном ядре и их интеграции в аппарат сплайсинга — сплайсосому, а также более длительного времени действия. На данный момент наибольшее распространение в качестве инструментов коррекции сплайсинга получили U7- и U1-мяРНП.

U7-мяРНП

U7-мяРНП участвует в процессинге 3'-конца пре-мРНК гистонов, однако в ходе исследований было показано, что U7-мяРНК, модифицированные определенным образом, могут применяться в терапевтических целях для коррекции нарушений сплайсинга, стимулируя пропуск или включение необходимых экзонов [15, 16].

U7-мяРНК дикого типа в составе U7-мяРНП человека состоит из 63 нуклеотидов [17] и включает в себя 3 основных компонента: HDE-связывающую последовательность (histone downstream element), Sm/Sm-like-связывающий сайт, а также структуру, представляющую собой петлю и шпильку, необходимую для поддержания стабильности комплекса [18, 19]. Чтобы использовать U7-мяРНП в качестве модулятора сплайсинга, необходимо внести ряд модификаций в последовательность ее мяРНК. Первая модификация заключается в замене канонического Sm/Sm-like связывающего сайта, имеющего последовательность 5'-AAUUUGUCUAG-3', на Sm-связывающий сайт мяРНК Sm-класса большой сплайсосомы, имеющий последовательность 5'-AAUUUUUGGAG-3' [18]. Вторая модификация заключается в замене HDE-связывающего сайта, имеющего нуклеотидную последовательность 5'-CAGCUCUUUU-3', на антисмысловый олигонуклеотид, обратнo-комплементарный интересующей последовательности на корректируемой пре-мРНК (рис. 3) [17, 18]. Доставка модифицированной U7-мяРНК в клетки организма вирусными векторами обеспечивает постоянную экспрессию без необходимости в повторном введении и продолжительное накопление терапевтических антисмысловых молекул в виде стабильного комплекса мяРНП.

Обычно модифицированная с целью коррекции сплайсинга U7-мяРНК содержит только один ан-

тисмысловой олигонуклеотид. Такая конструкция является однонаправленной, но в целях повышения эффективности модуляции сплайсинга также возможно создание как двунаправленных конструкций, содержащих сразу два антисмысловых олигонуклеотида, нацеленных на блокирование двух разных элементов сплайсинга (например, 5'-сайта сплайсинга и 3'-сайта сплайсинга) [20], так и бифункциональных конструкций, содержащих антисмысловой олигонуклеотид для блокирования элементов сплайсинга, а также последовательность связывания регуляторных элементов сплайсинга (ESE, ISE, ESS, ISS) (рис. 4) [21, 22].

Возможность изменять антисмысловые последовательности внутри модифицированной U7-мяРНК для каждого конкретного случая, высокая стабильность, эффективность и малые размеры, позволяющие использовать любые вирусные векторы в качестве средства доставки в клетки или органы-мишени, делают её крайне выгодным инструментом для коррекции различных нарушений сплайсинга [18].

Примеры коррекции сплайсинга при помощи U7-мяРНК

Применение модифицированных U7-мяРНК направлено на коррекцию нарушений сплайсинга (таблица), возникающих вследствие разрушения канониче-

ских сайтов сплайсинга, создания новых или усиления скрытых сайтов сплайсинга, а также нарушения мотивов экзонных и интронных сайленсеров или энхансеров сплайсинга. Например, данная конструкция может быть использована для блокирования активированных скрытых сайтов или для стимуляции пропуска экзона за счет блокирования его донорного или акцепторного сайтов сплайсинга, если экзон содержит вариант, приводящий к образованию преждевременного стоп-кодона.

Известно о проведении в настоящее время клинического испытания препарата на основе модифицированной U7-мяРНК, действие которого заключается в стимуляции пропуска экзона 2 гена *DMD* [23]. Согласно результатам доклинических исследований при введении всего одной дозы препарата аденоассоциированного вирусного вектора, несущего модифицированную U7-мяРНК, субъектам, у которых обнаружена дупликация данного экзона, удаётся достичь пропуска либо одной, либо обеих копий экзона 2 гена *DMD*, что в обоих случаях приводит к синтезу функционального белка.

U1-мяРНК

Строение и функции

Одним из функциональных элементов аппарата сплайсинга является U1-мяРНК, который участву-

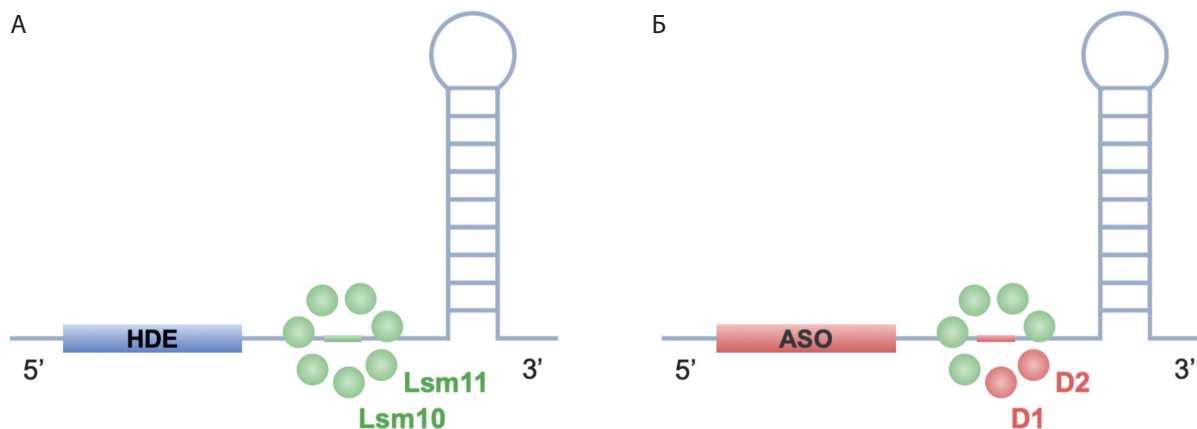


Рис. 3. Схематическое изображение строения U7-мяРНК. А. Структура U7-мяРНК дикого типа; Б. Структура модифицированной U7-мяРНК, у которой HDE-связывающий сайт заменен антисмысловой последовательностью. Lsm10 и Lsm11 – U7-специфичные Sm-like белки, участвующие в регуляции процессинга гистонов; D1 и D2 – ассоциированные с комплексом сплайсосомы белки, участвующие в регуляции сплайсинга.

Fig. 3. Scheme of U7 snRNA. A. Structure of wild-type U7 snRNA; B. Structure of a modified U7 snRNA in which the HDE-binding site is replaced by an antisense sequence. Lsm10 and Lsm11 are U7-specific Sm-like proteins involved in the regulation of histone processing; D1 and D2 are spliceosome complex-associated proteins involved in the regulation of splicing.

ет в распознавании 5'-сайта сплайсинга, связываясь с ним специфическим участком U1-мяРНК.

В состав U1-мяРНК человека входят U-богатая некодирующая последовательность РНК длиной 164 нуклеотида, Sm-белки а также специфичные для U1-мяРНК белки: U1A, U1C, U1-70K (рис. 5) [29], необходимые для сохранения структуры комплекса и взаимодействия с другими элементами сплайсосомы в ходе сплайсинга.

В ходе ранее проведённых исследований было выявлено, что U1-мяРНК продуцируется клетками в гораздо большем количестве, чем остальные мяРНК, что предполагало проявление функциональной актив-

ности данного комплекса в других процессах помимо сплайсинга, а впоследствии были представлены данные об участии U1-мяРНК в полиаденилировании 3'-конца пре-мРНК и транскрипции [29-31].

Использование в качестве инструмента коррекции сплайсинга

В ходе изучения роли U1-мяРНК в распознавании 5'-сайта сплайсинга в 1986 г. было предложено её использование в качестве инструмента коррекции нарушений сплайсинга, заключающееся в специфической модификации сайта связывания U1-мяРНК ди-

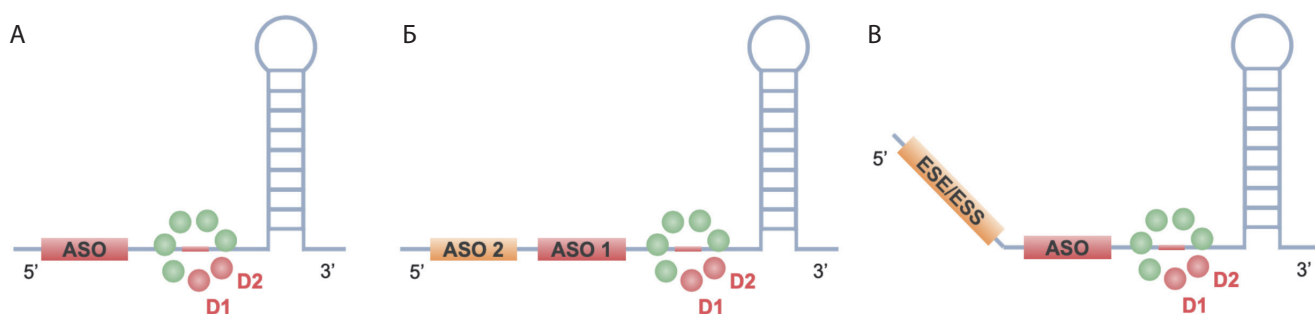


Рис. 4. Строение модифицированных U7-мяРНК, содержащих: А – один антисмысловый олигонуклеотид, Б – два антисмысловых олигонуклеотида, В – мотив регуляторного элемента сплайсинга и антисмысловый олигонуклеотид; ASO – антисмысловый олигонуклеотид; ESE – экзонный энхансер сплайсинга, ESS – экзонный сайленсер сплайсинга; D1 и D2 – ассоциированные с комплексом сплайсосомы белки, участвующие в регуляции сплайсинга.

Fig. 4. Structure of modified U7 snRNAs containing: А – one antisense oligonucleotide, Б – two antisense oligonucleotides, В – splicing regulatory element motif and antisense oligonucleotide; ASO – antisense oligonucleotide; ESE – exon splicing enhancer; ESS, exon splicing silencer; D1 and D2 are spliceosome complex-associated proteins involved in the regulation of splicing.

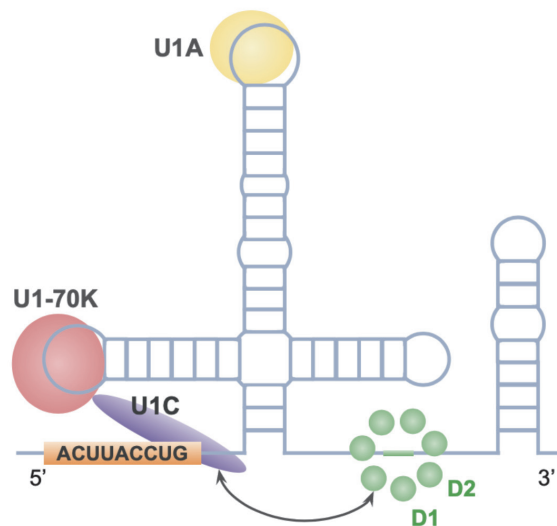


Рис. 5. Строение U1-мяРНК. Последовательность ACUUACCUG – сайт связывания с 5'-сайтом сплайсинга. D1 и D2 – ассоциированные с комплексом сплайсосомы белки, участвующие в регуляции сплайсинга.

Fig. 5. Structure of U1-snRNP. The ACUUACCUG sequence is the binding site for the 5' splicing site. D1 and D2 are spliceosome complex-associated proteins involved in the regulation of splicing.

Таблица. Применение модифицированной U7-мяРНК для коррекции нарушений сплайсинга (литературные данные)
Table. Use of modified U7 snRNA for correction of splicing disorders (literature data)

Исследуемый вариант, заболевание	Нарушение	Решение	Результаты	Объект исследования	Источник
<i>HBB</i> (NM_000518.5): с.79G>A; (p.Glu27Lys), β-талассемия	Активация скрытого 5'-сайта сплайсинга внутри экзона 1, приводящая к делеции 16 нуклеотидов на уровне мРНК и формированию преждевременно-го стоп-кодона.	Несколько вариантов модифицированной последовательности U7-мяРНК мыши, направленных на различные участки скрытого донорного сайта сплайсинга с целью его блокирования. Для доставки конструкций использовались лентивирусные векторы. С целью определения наиболее эффективного участка локализации было создано 14 конструкций с шагом 5 (6 шт.) и 1 (8 шт.) нуклеотидов от предыдущего. Все олигонуклеотиды располагались не ближе, чем за 6 нуклеотидов от канонического донорного сайта сплайсинга для предотвращения нарушения его функционирования.	Наиболее эффективной оказалась конструкция, комплементарная позициям 102-126 экзона 1, приводя к восстановлению экспрессии белка дикого типа в количестве 86% от нормы. Наибольший негативный эффект коррекции наблюдался при использовании конструкции, затрагивающей участок на 3'-конце экзона, который по предположению исследователей является экзонным энхансером сплайсинга.	HeLa-B ^E клетки	[24]
<i>HBB</i> (NM_000518.5): с.316-197C>T, β-талассемия	Вариант с.316-197C>T формирует донорный сайт и активирует скрытый акцепторный сайт сплайсинга псевдоэкзона (73 п.н.) внутри последовательности интрона 2, что приводит к inserции на уровне мРНК и образованию преждевременного стоп-кодона.	Для коррекции нарушения сплайсинга использовали 9 различных конструкций модифицированной U7-мяРНК, блокирующих сайты сплайсинга, сайт ветвления и экзонный энхансер сплайсинга псевдоэкзона, как по отдельности, так и совместно. Трансдукцию клеток осуществляли с использованием лентивирусного вектора.	Наибольшую эффективность продемонстрировала двунаправленная U7-мяРНК конструкция, содержащая антисмысловую последовательность как к скрытому сайту ветвления, так и к ESE псевдоэкзона с эффективностью коррекции сплайсинга до 10%.	Эритроидные клетки-предшественники пациента с исследуемым вариантом	[25]
<i>GAA</i> (NM_000152.5): с.-32-13T>G, болезнь Помпе	Вариант с.-32-13T>G «ослабляет» акцепторный сайт сплайсинга экзона 2, из-за чего происходят как полный пропуск данного экзона, так и делеция части экзона на уровне мРНК вследствие активации скрытого акцепторного сайта сплайсинга внутри последовательности экзона 2. Количество транскрипта дикого типа составляет при этом около 15%.	Для идентификации репрессоров включения экзона 2 в состав мРНК был использован набор неперекрывающихся АСО в составе U7-мяРНК длиной 20 нуклеотидов, покрывающих в сумме весь экзон 2, а также часть интрона 1. Трансдукция фибробластов пациента, гетерозиготного по варианту с.-32-13T>G, осуществлялась с использованием лентивирусного вектора, несутщего модифицированную U7-мяРНК.	В ходе исследования было выявлено, что U7-мяРНК, нацеленные на две области в интроне (от с.-32-179 до с.-32-159 и от с.-32-219 до с.-32-199), способствовали включению экзона 2 в состав мРНК. Для поиска наиболее оптимального расположения U7-мяРНК было создано дополнительно по 6 конструкций с шагом 2 нуклеотида от с.-32-179 и с.-32-219, что позволило выявить участки -32-183 и с.-32-185, способствующие включению экзона 2 в состав мРНК с немного большей эффективностью.	Фибробласты пациента с исследуемым вариантом	[26]

Продолжение таблицы см. на стр. 11.

Исследуемый вариант, заболевание	Нарушение	Решение	Результаты	Объект исследования	Источник
<i>RYRI</i> (NM_000540.3):, c.14646+2563C>T. Болезнь центрального стержня	Вариант c.14646+2563C>T образует сильный донорный сайт сплайсинга и приводит к экзонизации фрагмента интрона 101 длиной 99 п.н.	Для коррекции нарушения использовали 7 АСО, направленных на блокирование как сайтов сплайсинга, так и ESE псевдоэкзона. В дальнейшем наиболее эффективные АСО включали в состав U7-мРНК. Трансдукция MF-клеток осуществлялась с использованием лентивирусного вектора, несущего модифицированную с U7-мРНК.	Наибольшая эффективность продемонстрирована при одновременной трансфекции двух конструкций, блокирующих ESE псевдоэкзона, приводя к снижению количества aberrантного транскрипта на 80% и увеличению количества транскрипта дикого типа.	Миобласты пациента с исследуемым вариантом	[27]
Инсерция ретротранспозона в интроне 5 гена <i>GLBI</i> , мукополисахаридоз IVB типа [28]	Инсерция ретротранспозона в интроне 5 гена <i>GLBI</i> , приводящая к включению в последовательность мРНК скрытого экзона.	Для коррекции сплайсинга использовали различные модификации U7-мРНК для блокирования цис-регуляторных элементов сплайсинга скрытого экзона, в том числе бифункциональные конструкции, содержащие как антисмысловую последовательность, так и мотив сайленсера сплайсинга - hnRNP A1. Проводили ко-трансфекцию модельной линии клеток - использовали плазмидный вектор с исследуемым фрагментом гена и вектор, экспрессирующий модифицированную U7-мРНК.	Наиболее эффективной оказалась конструкция, блокирующая акцепторный сайт сплайсинга скрытого экзона и несущая мотив сайленсера сплайсинга, демонстрируя отсутствие скрытого экзона в 85% транскриптов.	Модельная линия клеток HEK293T и экспрессирующий исследуемый фрагмент плазмидный вектор	[28]

кого типа (5'-ACUUACCUG-3') с целью восстановления распознавания нарушенной последовательности сайта сплайсинга [32]. В данной работе исследователи вносили мутации в донорный сайт гена аденовируса *E1A*, нарушающие его распознавание, и проводили соответствующие модификации последовательности U1-мРНК. Полученные фрагменты помещали в экспрессионные векторы pSV40, которыми проводили ко-трансфекцию модельной клеточной линии HeLa. Распознавание донорного сайта сплайсинга удалось восстановить благодаря модифицированной U1-мРНК и нивелировать таким образом нарушение сплайсинга. Впоследствии аналогичные эксперименты исследователи проводили для изучения возможности применения модифицированной U1-мРНК в целях коррекции нарушений сплайсинга в генах *F7* (дефицит фактора свертывания крови VII), *TCIRG1* (пигментный ретинит), *MPZ* (исследовали патогенный ва-

риант, ассоциированный с болезнью Шарко-Мари-Тута, тип 1B) [33-35].

Результаты применения данной методики на фибробластах пациента впервые были опубликованы R. Sánchez-Alcudi и соавт. в 2011 году, которые использовали модифицированную U1-мРНК для восстановления распознавания экзона 13 гена *PCCA* (пропионовая ацидемия), нарушенного вследствие варианта *PCCA*(NM_000282):c.1209+3A>G, идентифицированного у четверых пациентов (у троих – в гетерозиготном состоянии, у одного – в гомозиготном) [36]. Последовательность донорного сайта дикого типа данного экзона комплементарна лишь шести из девяти нуклеотидов консенсусной последовательности связывания U1-мРНК (по оценкам исследователей, 40% донорных сайтов сплайсинга имеют 2 нуклеотида, не соответствующих последовательности сайта связывания U1-мРНК, 22% – 3 нуклеотида, и 5% – 4 нуклеоти-

да [37]). Выявленный вариант снижает «силу» данного сайта, нарушая таким образом его распознавание аппаратом сплайсосомы, что в итоге приводит к делеции целого экзона на уровне мРНК. Исследователи создали несколько модифицированных U1-мяРНК от специфичной лишь к варианту с.1209+3A>G до модификации, комплементарной последним трём нуклеотидам экзона и первым восьми интрона, в результате использования которой в 100% транскриптов присутствовал нераспознаваемый U1-мяРНК дикого типа экзон 13. В ходе эксперимента также было продемонстрировано, что чрезмерная экспрессия U1-мяРНК дикого типа в фибробластах пациента не приводит к восстановлению сплайсинга, а восстановление распознавания экзона достигли лишь применяя специфично модифицированные молекулы U1-мяРНК, причем возрастание количества транскриптов дикого типа коррелировало с увеличением числа специфично модифицированных нуклеотидов в сайте связывания.

В 2014 г. была опубликована работа, в которой исследователи применяли модифицированную U1-мяРНК для коррекции нарушения сплайсинга вследствие варианта *F7*(NM_000131.4):с.859+5G>A. В качестве экспрессионного организма мутантного белка использовали модельных мышей. После введения экспрессирующей модифицированную U1-мяРНК (U1+5a) вектора уровень hFVII в плазме крови вырос с недетектируемого до 8,5% от уровня, полученного после введения контрольной плазмиды, экспрессирующей *F7* дикого типа [38].

Однако всё чаще стала подниматься проблема ограниченности данной методики, поскольку модифицированная U1-мяРНК является уникальной для конкретной мутации, а также необходимо учитывать возможный «off-target» эффект, то есть неспецифическое связывание модифицированного фрагмента с последовательностями пре-мРНК. В связи с этим E.F. Alanis с соавт. в 2012 г. предложили модифицировать U1-мяРНК с целью её комплементарности не непосредственно донорному сайту сплайсинга, а к участку в диапазоне от позиции +7 до +30 относительно 3'-конца экзона. Такие конструкции называли экзон-специфичными U1-мяРНК (ExSpeU1) (рис. 6). Чтобы доказать перспективность такого подхода, они протестировали несколько U1-мяРНК, комплементарных интронной последовательности вне донорных сайтов сплайсинга экзона 5 гена *F9*, экзона 12 гена *CFTR* и экзона 7 гена *SMN2*. Путём отбора наиболее эффективных конструкций для каждого исследуемого фрагмента были выявлены ExSpeU1, позволяющие восстановить распозна-

вание соответствующего экзона при наличии различных мутаций, затрагивающих последовательность 5'-сайта сплайсинга [39]. Последовательности интронов менее консервативны, поэтому ожидаемый «off-target» эффект значительно ниже. Механизм коррекции сплайсинга при использовании ExSpeU1 в настоящее время не до конца ясен, ведь такой U1-мяРНК не связывается напрямую с 5'-сайтом сплайсинга, однако предполагается, что он «привлекает» белковые факторы сплайсинга к мутантному сайту [40]. В 2020 г. D. Balestra и соавт. разработали систему коррекции нарушения сплайсинга при наличии варианта *FAH*(NM_000137.4):с.706G>A; р.(Ala236Thr) на основе модифицированной U1-мяРНК и аденоассоциированного вирусного вектора 8 серотипа в качестве средства доставки, эксперимент проводили на мышечных гепатоцитах. Подобрали и применили наиболее эффективную модификацию U1-мяРНК, исследователи провели масштабный анализ её влияния на экспрессию 13000 генов, в ходе которого были получены данные, свидетельствующие об увеличенной экспрессии 5 генов, а у 8 генов отметили снижение экспрессии [41], однако для полноценного и достоверного анализа необходимо проведение транскриптомного исследования для каждой уникальной конструкции. Экзон-специфичную модификацию U1-мяРНК применили для стимулирования включения экзона 7 гена *SMN2* в модельных СМА-мышцах [42]. Исследователям удалось достичь увеличения уровня белка SMN и скорректировать фенотип мышей и с умеренной и с тяжелой формой СМА, увеличив продолжительность жизни с 10 до 219 дней. ExSpeU1 доставляли в клетки с помощью аденоассоциированного вирусного вектора 9 серотипа, экспрессия модифицированной U1-мяРНК сохранялась в течение одного месяца.

SMaRT (spliceosome-mediated mRNA trans-splicing), система модификации пре-мРНК на основе механизма транс-сплайсинга

Преобладающей формой сплайсинга является цис-сплайсинг, при котором из одной молекулы пре-мРНК в ходе процессинга образуется одна молекула зрелой мРНК, однако у многих организмов, в том числе у человека, также происходит так называемый транс-сплайсинг, в ходе которого в одну «химерную» молекулу мРНК объединяются экзоны из более чем одной пре-мРНК [43]. На данном явлении основывается методика SMaRT (spliceosome-mediated mRNA trans-splicing), заключающаяся в использовании экзоген-

ной индуцирующей транс-сплайсинг пре-мРНК молекулы (pre-mRNA *trans*-splicing molecule, PTM) для коррекции мутаций на пост-транскрипционном уровне путем редактирования последовательности мРНК.

РТМ (рис. 7) связывается с мишенью (молекулой эндогенной пре-мРНК) и запускает механизм транс-сплайсинга с образованием мРНК, содержащей как последовательность эндогенной мРНК, так и кодирующую последовательность введенной в клетку конструкции. Ключевыми компонентами РТМ являются следующие структурные элементы [44]:

- сайт связывания с эндогенной пре-мРНК, представленный антисмысловой последовательностью нуклеотидов, комплементарной участку таргетной молекулы пре-мРНК;
- интронная последовательность, содержащая все функциональные элементы сплайсинга;

— кодирующая последовательность, которая должна заменить фрагмент эндогенной мРНК. Существуют три подхода использования SMarT: замена 5'-экзона, 3'-экзона и замена внутреннего экзона (рис. 8).

Основными преимуществами данной методики в качестве средства генной терапии являются:

- небольшой размер конструкции РТМ;
- отсутствие влияния на экспрессию исследуемого гена;
- высокая специфичность, т. к. в среднем участок связывания РТМ обладает длиной около 100 п.н., сводя к минимуму риск off-target эффекта;
- возможность применения для коррекции мутаций «усиления функции», т. к. она позволяет снизить количество патогенного белка.

Впервые применение SMarT было описано в 1999 г. М. Puttaraju и соавт., которые продемонстри-

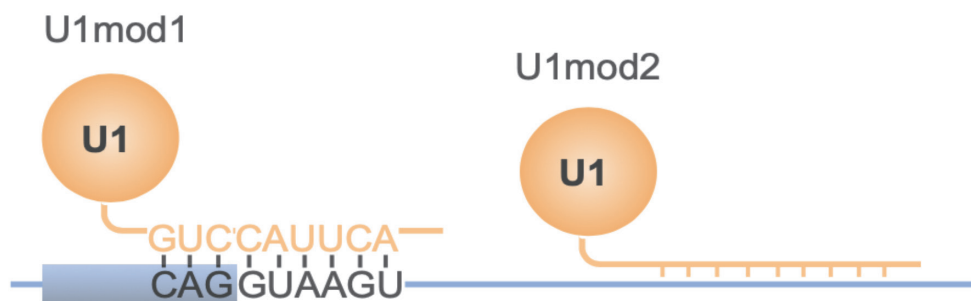


Рис. 6. Изображения двух различных комплексов U1-мяРНП, связывающихся со специфической последовательностью пре-мРНК при помощи модифицированного участка U1-мяРНК. U1mod1 – конструкция, полностью специфичная донорному сайту сплайсинга, U1mod2 – экзон-специфичная конструкция, связывающаяся с менее консервативной интронной последовательностью, может применяться при наличии различных вариантов, нарушающих каноническую последовательность донорного сайта сплайсинга.

Fig. 6. Images of two different U1-snRNP complexes binding to a specific pre-mRNA sequence via a modified U1-snRNA region. U1mod1 is a construct that is completely specific to the donor splice site, U1mod2 is an exon-specific construct that binds to a less conserved intron sequence and can be used in the presence of various variants that damage the canonical sequence of the donor splice site.



Рис. 7. Схема строения РТМ. GU – канонические динуклеотиды 5'-сайта сплайсинга; PPT – полипиримидиновый тракт; A – точка ветвления; AG – канонические динуклеотиды 3'-сайта сплайсинга.

Fig. 7. Scheme of the PTM structure. GU – canonical dinucleotides of the 5' splicing site; PPT – polypyrimidine tract; A – branch point; AG – canonical dinucleotides of the 3' splicing site.

ровали возможность индуцирования транс-сплайсинга путём введения молекулы для коррекции эндогенной мРНК, а именно замены экзона [45]. Впоследствии эта же группа исследователей доказала эффективность данной методики *in vivo*, применив её для восстановления функции трансмембранного регулятора муковисцидоза в модельной системе ксенотрансплантата легочной ткани человека [46]. Исследователи использовали РТМ для замены экзона гена *CFTR*, содержащего самый частый в европейских популяциях вариант [47], ассоциированный с муковисцидозом *CFTR*(NM_000492.4):с.1521_1523del (p.Phe508del). Впоследствии было проведено множество исследований, посвящённых изучению и использованию SMaRT-методики для коррекции патогенных вариантов при различных наследственных заболеваниях, в том числе узлом буллезном эпидермолизе (*COL17A1*) [48], дисферлинопатии (*DYSF*) [49] и т. д.

Недавние исследования были посвящены коррекции патогенных вариантов, приводящих к бета-талассемии (*HBB*) [50], мышечной дистрофии Эмери-Дрейфуса (*LMNA*) [51] и тяжёлому генерализованному простому буллезному эпидермолизу (*KRT5* и *KRT14*) [52]. В первом случае исследователи отобрали 6 последовательностей для связывания с РТМ, все были локализованы в интроне 2 гена *HBB*, далее были построены конструкции на основе лентивирусного вектора, содержащие сайт связывания с молекулой пре-мРНК, 5'-сайт сплайсинга и кодирующую последовательность, после этого была проведена трансдукция эритроидных клеток и анализ транс-сплайсинга; максимальное количество «химерных» транскриптов составило 0,09% от общего числа. Azibani с соавт. использовали SMaRT для замены первых пяти экзонов гена *LMNA*. Исследователи создали 9 конструкций РТМ, различающихся последовательностью домена связывания с пре-мРНК,

в трёх случаях удалось добиться транс-сплайсинга. В результате исследования конструкция на основе адеиноассоциированного вирусного вектора была применена *in vivo* на новорождённых мышах; наличие «химерных» транскриптов обнаруживали спустя 50 дней после инъекции, однако также в малом количестве. Peking P. с соавт. применяли SMaRT-методику для коррекции мутации в гене *KRT14*, создали конструкцию на основе ретровирусного вектора, несущую 7 первых экзонов данного гена, ею проводили трансдукцию кератиноцитов пациента с тяжёлым простым буллезным эпидермолизом, трансплантированных мышам. Полученные результаты позволили сделать вывод об эффективности данного способа коррекции, исследователи отметили смягчение фенотипа и стабилизацию эпидермиса.

Выбор вирусных векторов для доставки антисмысловых конструкций в клетки

Для проявления своей терапевтической активности антисмысловые молекулы должны попасть в ядро клетки, что осложняется их нестабильностью вне ядра и не всегда достаточным поглощением клетками, поэтому главным преимуществом использования модифицированных мРНК является возможность их доставки при помощи вирусных векторов, которые поддерживают постоянный уровень экспрессии антисмысловых молекул и могут быть направлены в определённые ткани и типы клеток. Различные вирусные векторы были использованы исследователями в качестве средства доставки мРНК, рассмотрим их основные преимущества и недостатки.

Ретровирусные векторы были наиболее используемыми в генной терапии до проведения клинического исследования, в ходе которого у четверых из девяти участников с X-сцепленным тяжёлым комбиниро-

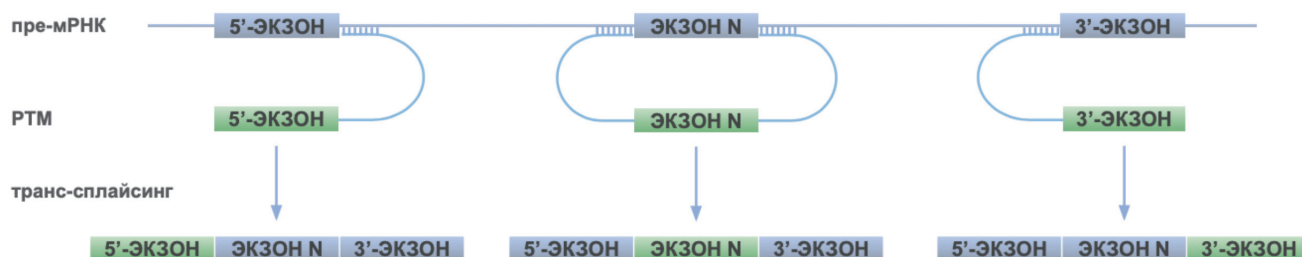


Рис. 8. Схема взаимодействия РТМ с молекулой пре-мРНК с целью замены 5'-экзона, внутреннего экзона и 3'-экзона.

Fig. 8. Scheme of RTM interaction with a pre-mRNA molecule to replace the 5'-exon, internal exon and 3'-exon.

ванным иммунодефицитом развилась лейкемия [53]. Основными рисками использования ретровирусных векторов является возможность проявления их онкогенной активности и продукции способных к репликации вирусных частиц, которая значительно ниже у лентивирусных векторов, однако при их применении риск онкогенеза также сохраняется. Главным преимуществом таких векторов является длительное поддержание экспрессии трансгена [54]. Модифицированные U7-мяРНК успешно применяли на модельных организмах, используя лентивирусные векторы, для стимулирования включения экзона 7 гена *SMN2* в мРНК, значительно корректируя при этом фенотип мышей с тяжелой формой СМА [55].

Наиболее перспективными по совокупности свойств на данный момент являются аденоассоциированные вирусные векторы, которые при использовании в качестве средства доставки трансгена практически не встраиваются в геном клетки, образуя эписомальные конкатемеры, сводя таким образом до минимума риск развития онкологических заболеваний, и имеют значительно более низкую иммуногенность по сравнению с другими типами вирусных векторов. Различные препараты генной терапии, использующие аденоассоциированные вирусные векторы, находятся в настоящее время в разработке, на стадии клинических исследований и в активном использовании. Например, в известном препарате Zolgensma® (онасемноген абепарвовек; Novartis, Швейцария), одобренном в том числе в РФ для лечения СМА, также используется аденоассоциированный вирусный вектор серотипа 9 для доставки кодирующей последовательности гена *SMN1* [56]. На данный момент известно о проведении по меньшей мере 136 клинических исследований препаратов, в которых используются аденоассоциированные вирусные векторы: в большинстве из них — одноцепочечные (ssAAV) и лишь в семи — двуцепочечные (scAAV) [57]. Двуцепочечные аденоассоциированные вирусные векторы были разработаны с целью сократить время от трансдукции до экспрессии трансгена и повышения стабильности генома вектора. Сообщается также об эффективности scAAV в 5–140 раз выше в определённых типах тканей по сравнению с ssAAV [54]. Несмотря на и так малую вместимость аденоассоциированных вирусных векторов (могут переносить трансген длиной не более 4,7 т.п.н.), наличие второй цепи в геноме вируса сокращает её вдвое [58], однако этого всё ещё достаточно для антисмысловых молекул. Сообщается о длительной в течение 15 лет экспрессии трансгена после инъекции аденоассоциирован-

ных вирусных векторов при исследовании на приматах с болезнью Паркинсона [58]. Несмотря на то, что в ходе множества исследований были продемонстрированы различия в тропизме определенных серотипов вирусных векторов к различным тканям, обусловленные особенностями строения капсида, Pillay с соавт. показали, что вирусные векторы большинства серотипов используют один и тот же рецептор для проникновения в клетки, что свидетельствует о других механизмах, определяющих тканеспецифичность векторов [59].

Заключение

Антисмысловые молекулы хорошо изучены и даже используются в настоящее время в терапии наследственных заболеваний, однако область их применения ограничивается их главным недостатком — специфичностью, отсутствием универсальности иногда даже в рамках одного заболевания, ведь они разрабатываются для определенного функционального элемента сплайсинга. Помимо этого, велика значимость экономического фактора: лечение АСО подразумевает постоянные инъекции лекарственного препарата в течение жизни. Например, основанному на АСО препарату Spinraza® (нусинерсен; Biogen, США) для лечения СМА сложно конкурировать на рынке лекарственных веществ с препаратом Zolgensma® (онасемноген абепарвовек; Novartis, Швейцария), для проявления терапевтического эффекта которого требуется лишь одна инъекция [56]. Данный недостаток нивелируется при использовании модифицированной U7-мяРНК, терапевтическое действие которой основывается на том же механизме. При использовании аденоассоциированных вирусных векторов для доставки модифицированной U7-мяРНК возможно поддержание её экспрессии в течение длительного времени, если целью являются неделящиеся клетки.

Восстановление распознавания экзона при помощи модифицированной U1-мяРНК также не теряет актуальность для исследования и последующего применения в терапии наследственных заболеваний, особенно учитывая последние работы, результаты которых демонстрируют возможность создания универсальной экзон-специфичной конструкции, позволяющей использовать её в целях коррекции нарушений сплайсинга, возникающих при различных мутациях в одном сайте сплайсинга, а также обладающей значительно сниженным off-target эффектом, исследование которого, однако, в настоящее время не является совершенным

и безусловно требует дальнейшего развития для отбора наиболее безопасных конструкций.

Модуляция сплайсинга посредством SMaRT-технологии позволяет рассматривать данную методику для коррекции множества генетических вариантов, так как она подразумевает замену от одного до нескольких экзонов в молекуле мРНК. Однако согласно имеющимся на данный момент результатам исследований, эффективность такого подхода остается на низком уровне.

Главными преимуществами антисмысловых молекул на фоне других методов геномной терапии являются отсутствие их влияния на геном, ведь они взаимодействуют лишь с пре-мРНК, а также малый размер таких конструкций, что позволяет рассматривать фактически любой тип вирусных векторов в качестве средства доставки, сосредотачиваясь на повышении тканеспецифичности, сведении к минимуму иммунного ответа и риска малигнизации.

Несмотря на развитие и совершенствование методов геномного редактирования, модифицированные мРНК, пожалуй, имеют такой же потенциал для коррекции нарушений сплайсинга, однако до их активного применения в терапии наследственных заболеваний предстоит достичь максимально возможной эффективности модуляции сплайсинга и исключить вероятность неспецифического действия.

Литература/References

- Gao D., Morini E., Salani M., Krauson A.J. et al. A deep learning approach to identify gene targets of a therapeutic for human splicing disorders. *Nature Communications*. 2021;12(1).
- Wang Z., Burge C.B. Splicing regulation: From a parts list of regulatory elements to an integrated splicing code. *RNA*, 2008;14(5):802–813.
- Wang G.S., Cooper T.A. Splicing in disease: disruption of the splicing code and the decoding machinery. *Nature Reviews Genetics*, 2007;(10):749–761.
- Tellier M., Maudlin I., Murphy S. Transcription and splicing: A two-way street. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*, 2020;11(5):e1593.
- Stenson P.D., Mort M., Ball E.V. et al. The Human Gene Mutation Database: 2008 update. *Genome Medicine*, 2009;1(1).
- Havens M.A., Duelli D.M., Hastings M.L. Targeting RNA splicing for disease therapy. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*, 2013;4(3):247–266.
- Wally V., Murauer E.M., Bauer J.W. Spliceosome-Mediated Trans-Splicing: The Therapeutic Cut and Paste. *Journal of Investigative Dermatology*, 2012;132(8):1959–1966.
- Rigo F., Seth P.P., Bennett C.F. Antisense oligonucleotide-based therapies for diseases caused by pre-mRNA processing defects. *Systems Biology of RNA Binding Proteins* 2014:303–352.
- <https://www.guidetopharmacology.org/GRAC/LigandDisplayForward?tab=summary&ligandId=9416>
- Gidaro T., Servais L. Nusinersen treatment of spinal muscular atrophy: current knowledge and existing gaps. *Developmental Medicine & Child Neurology*. 2019; 61.1: 19–24.
- <https://www.fda.gov/files/advisory%20committees/published/Sarepta-Briefing-Information-for-the-April-25--2016-Meeting-of-the-Peripheral-and-Central-Nervous-System-Drugs-Advisory-Committee.pdf>
- Mendell J.R., Rodino-Klapac L.R., Sahenk Z. et al. Eteplirsen for the treatment of Duchenne muscular dystrophy. *Annals of neurology* 2013;Nov;74(5):637–47.
- Kim J., Hu C., Moufawad El Achkar C., Black L.E. et al. Patient-Customized Oligonucleotide Therapy for a Rare Genetic Disease. *New England Journal of Medicine* 2019;381.17:1644–1652.
- Matera A.G., Terns R.M., Terns M.P. Non-coding RNAs: lessons from the small nuclear and small nucleolar RNAs. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2007;8(3):209–220.
- Preedagasamzin S., Nualkaew T., Pongrujirorn T. et al. Engineered U7 snRNA mediates sustained splicing correction in erythroid cells from β -thalassemia/HbE patients. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2018;499(1):86–92.
- Malcher J., Heidt L., Goyenvalle A. et al. Exon Skipping in a Dysf-Missense Mutant Mouse Model. *Molecular therapy. Nucleic acids*, 2018;13:198–207.
- Mowry K., Steitz J. Identification of the human U7 snRNP as one of several factors involved in the 3' end maturation of histone pre-messenger RNA's. *Science*, 1987;238(4834):1682–1687.
- Lesman D., Rodriguez Y., Rajakumar D., Wein N. U7 snRNA, a Small RNA with a Big Impact in Gene Therapy. *Human Gene Therapy* 2021;32.21–22:1317–1329.
- Schaufele F., Gilmartin G.M., Bannwarth W., Birnstiel M.L. Compensatory mutations suggest that base-pairing with a small nuclear RNA is required to form the 3' end of H3 messenger RNA. *Nature*, 1986;323(6091):777–781.
- Suter D., Tomasini R., Reber U., et al. Double-Target Antisense U7 snRNAs Promote Efficient Skipping of an Aberrant Exon in Three Human β -Thalassemic Mutations. *Human Molecular Genetics*, 1999;8(13), 2415–2423.
- Meyer K., Schümperli D. Antisense Derivatives of U7 Small Nuclear RNA as Modulators of Pre-mRNA Splicing. *Alternative Pre-mRNA Splicing*, 2021:481–494.
- Verhaart I.E., Aartsma-Rus A. AON-Mediated Exon Skipping for Duchenne Muscular Dystrophy. In Zaher A., ed. *Neuromuscular Disorders*. InTech, Aug. 2012. Crossref, doi:10.5772/16668.
- <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04240314?term=U7&draw=2&rank=1>
- Preedagasamzin S., Nualkaew T., Pongrujirorn T. et al. Engineered U7 snRNA mediates sustained splicing correction in erythroid cells from β -thalassemia/HbE patients. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2018;499(1):86–92.
- Nualkaew T., Jearawiriyapaisarn N., Hongeng S. et al. Restoration of correct β IVS2-654-globin mRNA splicing and HbA production by engineered U7 snRNA in β -thalassaemia/HbE erythroid cells. *Scientific Reports*. 2019;9(1):1–8.
- Van der Wal E., Bergsma A.J., Pijnenburg J.M. et al. Antisense Oligonucleotides Promote Exon Inclusion and Correct the Common c.-32-13T>G GAA Splicing Variant in Pompe Disease. *Molecular Therapy - Nucleic Acids*, 2017;7: 90–100.
- Rendu J., Brocard J., Denarier E., et al. Exon Skipping as a Therapeutic Strategy Applied to an RYR1 Mutation with Pseudo-Exon Inclusion Causing a Severe Core Myopathy. *Human Gene Therapy*, 2013;24(7):702–713.
- Bychkov I., Kuznetsova A., Baydakova G. et al. Processed pseudogene insertion in GLB1 causes Morquio B disease by altering intronic splicing regulatory landscape. *npj Genomic Medicine*, 2022;7(1):1–6.

29. Pomeranz Krummel D.A., Oubridge C., Leung A.K. et al. Crystal structure of human spliceosomal U1 snRNP at 5.5 Å resolution, *Nature* 2009;458:475–480.
30. Kaida D., Berg M.G., Younis I., et al. U1 snRNP protects pre-mRNAs from premature cleavage and polyadenylation, *Nature* 2010;468:664–668.
31. Chiu A.C., Suzuki H.I., Wu X. et al. Transcriptional pause sites delineate stable nucleosome-associated premature polyadenylation suppressed by U1 snRNP, *Molecular cell*. 2018;69.4:648–663.
32. Zhuang Y., Weiner A.M. A compensatory base change in U1 snRNA suppresses a 5' splice site mutation. *Cell*, 1986;46(6):827–835.
33. Pinotti M., Balestra D., Rizzotto L. et al. Rescue of coagulation factor VII function by the U1+5A snRNA, *Blood* 2009;113(25):6461–6464
34. Susani L., Pangrazio A., Sobacchi C. et al. TCIRG1-dependent recessive osteopetrosis: mutation analysis, functional identification of the splicing defects, and in vitro rescue by U1 snRNA, *Human Mutation* 2004;24(3):225–235
35. Crehalet H., Latour P., Bonnet V. et al. U1 snRNA mis-binding: a new cause of CMT1B, *Neurogenetics*, 2009;11(1):13–19.
36. Sánchez-Alcudia R., Pérez B., Pérez-Cerdá C., et al. Overexpression of adapted U1snRNA in patients' cells to correct a 5' splice site mutation in propionic acidemia. *Molecular Genetics and Metabolism*, 2011;102(2):134–138.
37. Carmel I., Tal S., Vig I. et al. Comparative analysis detects dependencies among the 5' splice-site positions. *Rna*. 2004;10(5):828–840.
38. Balestra D., Faella A., Margaritis P. et al. An engineered U1 small nuclear RNA rescues splicing-defective coagulation F7 gene expression in mice. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 2014;12(2):177–185. doi:10.1111/jth.12471
39. Fernandez Alanis E., Pinotti M., Dal Mas A. et al. An exon-specific U1 small nuclear RNA (snRNA) strategy to correct splicing defects. *Human Molecular Genetics*, 2012;21(11):2389–2398.
40. Rogalska M.E., Tajnik M., Licastro D. et al. Therapeutic activity of modified U1 core spliceosomal particles. *Nature communications*. 2016;7:11–13
41. Balestra D., Scalet D., Ferrarese M. et al. A Compensatory U1snRNA Partially Rescues FAH Splicing and Protein Expression in a Splicing-Defective Mouse Model of Tyrosinemia Type I. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020;21(6):2136.
42. Donadon I., Bussani E., Riccardi F. et al. Rescue of spinal muscular atrophy mouse models with AAV9-Exon-specific U1 snRNA. *Nucleic Acids Research*. 2019;47.14:7618–7632
43. Lei Q., Li C., Zuo Z. et al. Evolutionary Insights into RNA trans-Splicing in Vertebrates. *Genome Biology and Evolution*, 2016;8(3):562–577.
44. Riedmayr L.M. SMaRT for Therapeutic Purposes. *Chimeric RNA*. Humana, 2020;219–232.
45. Puttaraju M., Jamison S.F., Mansfield S.G. et al. Spliceosome-mediated RNA trans-splicing as a tool for gene therapy. *Nature biotechnology*. 1999;17:246–52.
46. Liu X., Jiang Q., Mansfield S.G. et al. Partial correction of endogenous DeltaF508 CFTR in human cystic fibrosis airway epithelia by spliceosome-mediated RNA trans-splicing. *Nature biotechnology*. 2002; 20:47–52.
47. De Boeck K., Zolin A., Cuppens H. et al. The relative frequency of CFTR mutation classes in European patients with cystic fibrosis, *Journal of Cystic Fibrosis*, 2014;13(4):403–409.
48. Dallinger G., Puttaraju M., Mitchell L.G. et al. Development of spliceosome-mediated RNA trans-splicing (SMaRT) for the correction of inherited skin diseases. *Experimental dermatology*. 2003;12:37–46.
49. Philippi S., Lorain S., Beley C. et al. Dysferlin rescue by spliceosome-mediated pre-mRNA trans-splicing targeting introns harbouring weakly defined 3' splice sites. *Human Molecular Genetics* 2015;24:4049–60.
50. Uchida N., Washington K.N., Mozer B., et al. RNA trans-splicing targeting endogenous β -globin pre-messenger RNA in human erythroid cells. *Human gene therapy methods*. 2017;28.2:91–99.
51. Azibani F., Brull A., Arandel L. et al. Gene Therapy via Trans-Splicing for LMNA-Related Congenital Muscular Dystrophy, *Molecular Therapy - Nucleic Acids*, 2018;10:376–386.
52. Peking P., Breitenbach J.S., Ablinger M. et al. (2019). An ex vivo RNA trans-splicing strategy to correct human generalized severe epidermolysis bullosa simplex. *British Journal of Dermatology*, 2019;180(1):141–148.
53. Cavazzana-Calvo M., Hacein-Bey S., de Saint Basile G. et al. Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease. *Science* 2000;288:669–672
54. Benskey M.J., Sandoval I.M., Miller K. et al. Basic concepts in viral vector-mediated gene therapy. In *Viral Vectors for Gene Therapy*. Humana Press, 2019;3–26.
55. Meyer K., Marquis J., Trub J. et al. Rescue of a severe mouse model for spinal muscular atrophy by U7 snRNA-mediated splicing modulation. *Human Molecular Genetics* 2008;18:546–555.
56. Broekhoff T.F., Sweegers C.C.G., Krijkamp EM et al. Early Cost-Effectiveness of Onasemnogene Apeparovect-xioi (Zolgensma) and Nusinersen (Spinraza) Treatment for Spinal Muscular Atrophy I in The Netherlands With Relapse Scenarios. *Value in Health*. 2021;24(6):759–769.
57. Au HKE, Isalan M, Mielcarek M. Gene therapy advances: a meta-analysis of AAV usage in clinical settings. *Frontiers in medicine*, 2021;8.
58. Sehara Y, Fujimoto KI, Ikeguchi K et al. Persistent expression of dopamine-synthesizing enzymes 15 years after gene transfer in a primate model of Parkinson's disease. *Human gene therapy Clinical development*. 2017;28:74–79.
59. Pillay S, Meyer NL, Puschnik AS et al. An essential receptor for adenovirus-associated virus infection. *Nature*. 2016;530(7588):108–112.