

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202191469** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки
2021.10.19

(51) Int. Cl. *C12N 15/113* (2010.01)
A61K 31/7088 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2019.12.04

(54) **ВОССТАНОВЛЕНИЕ ПОСРЕДСТВОМ АНТИСМЫСЛОВЫХ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ
АВСА4 С АБЕРРАНТНЫМ СПЛАЙСИНГОМ**

(31) **18210107.1**

(72) Изобретатель:

(32) **2018.12.04**

**Коллин Роберт Вильгельмус Йоханна,
Гаранто Иглесиас Алехандро, Кремерс
Францискус Петер Мария (NL)**

(33) **EP**

(86) **PCT/EP2019/083618**

(87) **WO 2020/115106 2020.06.11**

(74) Представитель:

(71) Заявитель:

Медведев В.Н. (RU)

**СТИХТИНГ КАТОЛИКЕ
УНИВЕРСИТЕТ (NL)**

(57) Настоящее изобретение относится к области медицины. В частности, изобретение относится к новым антисмысловым олигонуклеотидам, которые могут использоваться для лечения, предупреждения и/или замедления болезни Штаргардта.

202191469
A1

202191469

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420- 569238EA/061

ВОССТАНОВЛЕНИЕ ПОСРЕДСТВОМ АНТИСМЫСЛОВЫХ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ АВСА4 С АБЕРРАНТНЫМ СПЛАЙСИНГОМ

Область изобретения

Изобретение относится к области медицины и иммунологии. В частности, оно относится к новым антисмысловым олигонуклеотидам, которые могут использоваться для лечения, предупреждения и/или отсрочивания ассоциированного с АВСА4 состояния.

Уровень техники, к которому относится изобретение

Аутосомно-рецессивные мутации в АВСА4 вызывают болезнь Штаргардта - прогрессирующее нарушение, характеризующееся снижением центрального зрения и часто вызывающее полную слепоту. Типичным признаком болезни Штаргардта является присутствие множества желтых пятен (крапинок), распределенных по главному дну пациентов. Ген АВСА4 включает 50 экзонов и кодирует белок, состоящий из 2273 аминокислот. Этот белок экспрессируется на наружных сегментах колбочковых и палочковых фоторецепторных клеток и играет важную роль в устраниении продуктов жизнедеятельности после фотопреобразования.

Помимо STGD1, варианты АВСА4 также могут приводить к другим подтипам заболеваний сетчатки от макулопатии типа "бычий глаз" до аутосомно-рецессивной палочко-колбочковой дистрофии (arCRD; Cremers et al, 1998; Maugeri et al, 2000) и панретинальной дистрофии (Cremers et al, 1998; Martinez-Mir et al, 1998), в зависимости от степени изменения аллелей.

Биаллельные варианты АВСА4 могут идентифицированы приблизительно в 80% случаев с STGD1 (Allikmets et al, 1997; Fujinami et al, 2013; Lewis et al, 1999; Maugeri et al, 1999; Rivera et al, 2000; Schulz et al, 2017; Webster et al, 2001; Zernant et al, 2011; Zernant et al, 2017), и 30% случаев с arCRD (Maugeri et al, 2000), после секвенирования кодирующих областей и фланкирующих участков сплайсинга. Как правило, индивидуумы с arCRD или панретинальной дистрофией имеют два сильно измененных аллеля АВСА4, в то время как индивидуумы с STGD1 имеют два умеренно измененных варианта или комбинацию мягкого и сильного вариантов (Maugeri et al, 1999; van Driel et al, 1998). Было предположено, что большинство укороченных вариантов АВСА4 у пациентов STGD1 соответствуют интронным областям гена, и действительно, на протяжении последних нескольких лет несколько групп продемонстрировали существование таких глубоких интронных вариантов (Bauwens et al, 2015; Vax et al, 2015; Braun et al, 2013; Lee et al, 2016; Schulz et al, 2017). Мутацией, которая часто присутствует у пациентов с STGD1 (-2-3% от всех случаев STGD1 в Западном мире имеют эту мутацию), является с.768G>Т, вариант, который задействует последний нуклеотид экзона 6. Эта мутация ослабляет донорный участок сплайсинга экзона 6, что приводит к использованию альтернативного донорного участка сплайсинга в интроне 6 и последующему удлинению транскрипта на 35 нуклеотидов. Спрогнозировано, что это удлинение приводит к сдвигу рамки считывания

и, таким образом, к преждевременной терминации синтеза белка ABCA4.

Тот факт, что значительное количество случаев STGD1 имеют вариант с.768G>T, делает его привлекательной мишенью для модулирующей сплайсинг терапии на основе антисмысловых олигонуклеотидов (AON). Таким образом, существует потребность в разработке AON для модулирования сплайсинга гена ABCA4 для обеспечения экспрессии функционального белка ABCA4 у индивидуумов, страдающих от болезни Штаргардта, в частности, с мутацией с.768G>T.

Сущность изобретения

В первом аспекте изобретение относится к антисмысловому олигонуклеотиду для перенацеливания сплайсинга, который связывается с и/или комплементарен полинуклеотиду с нуклеотидной последовательностью, как показано в SEQ ID NO: 4, предпочтительно антисмысловой олигонуклеотид связывается с или комплементарен полинуклеотиду с SEQ ID NO: 5, более предпочтительно антисмысловой олигонуклеотид связывается с или комплементарен полинуклеотиду с SEQ ID NO: 80, еще более предпочтительно антисмысловой олигонуклеотид связывается с или комплементарен полинуклеотиду, выбранному из группы, состоящей из SEQ ID NO: 7, 8, 9; 11, 12, 13; 15, 16, 17; 19, 20 и 21.

Во втором аспекте изобретение относится к вирусному вектору, экспрессирующему антисмысловой олигонуклеотид для перенацеливания сплайсинга, как определено в настоящем описании, когда он находится в условиях способствующих экспрессии молекулы.

В третьем аспекте изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей антисмысловой олигонуклеотид для перенацеливания сплайсинга, как определено в настоящем описании, или вирусный вектор, как определено в настоящем описании, и фармацевтически приемлемый эксципиент.

В четвертом аспекте изобретение относится к антисмысловому олигонуклеотиду для перенацеливания сплайсинга, как определено в настоящем описании, для применения в качестве лекарственного средства, предпочтительно для применения в качестве лекарственного средства для лечения связанного с ABCA4 заболевания или состояния, требующего модулирования сплайсинга ABCA4.

Подробное описание изобретения

По определению, антисмысловые олигонуклеотиды (AON) по существу комплементарны (являются антисмысловыми) их мишени, позволяя им связываться с соответствующей молекулой пре-мРНК, таким образом, без связи с теорией, препятствуя связыванию белков, необходимых для сплайсинга. Обычно это отсутствие связывания приводит к пропуску экзона-мишени, как авторы настоящего изобретения ранее показали для нескольких мутаций в ABCA4 (WO2018/109011).

Некоторые мутации создают новые акцепторные участки сплайсинга, донорные участки сплайсинга или экзонные энхансеры сплайсинга, что приводит к включению псевдоэкзонов в мРНК соответствующего гена. Мутация с.768G>T ослабляет донорный

участок сплайсинга экзона 6, что приводит к использованию альтернативного донорного участка сплайсинга ниже интрона 6 и последующему удлинению транскрипта на 35 нуклеотидов. Для восстановления сплайсинга у индивидуумов, имеющих мутацию с.768G>T, авторы изобретения сконструировали AON, которые специфически блокируют вновь используемый альтернативный донорный участок сплайсинга в интроне 6, и тем самым перенацеливают аппарат сплайсинга обратно на первоначальный участок в положении с.768.

Таким образом, в первом аспекте изобретение относится к антисмысловому олигонуклеотиду для перенацеливания сплайсинга, который связывает и/или комплементарен полинуклеотиду с нуклеотидной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 4. Предпочтительно антисмысловой олигонуклеотид связывает или комплементарен полинуклеотиду с SEQ ID NO: 5. Более предпочтительно антисмысловой олигонуклеотид связывает или комплементарен полинуклеотиду с SEQ ID NO: 80. Еще более предпочтительно антисмысловой олигонуклеотид связывает или комплементарен полинуклеотиду, выбранному из группы, состоящей из SEQ ID NO: 7, 8, 9; 11, 12, 13; 15, 16, 17; 19, 20 и 21.

Термины "антисмысловой олигонуклеотид" или "AON" используют в настоящем описании взаимозаменяемо, и подразумевают, что они относятся к олигонуклеотидной молекуле, содержащей нуклеотидную последовательность, которая по существу комплементарна нуклеотидной последовательности-мишени в молекуле пре-мРНК, hn-РНК (гетерогенная ядерная РНК) или мРНК. Степень комплементарности (или значительной комплементарности) антисмысловой последовательности предпочтительно является такой, что молекула, содержащая антисмысловую последовательность, может образовывать стабильный гибрид с нуклеотидной последовательностью-мишенью в молекуле РНК в физиологических условиях. Связывание AON с его мишенью может без труда оценивать специалист в данной области с использованием способов, которые известны в данной области, таких как анализ сдвига подвижности в геле, как описано в EP1619249.

Термин "комплементарный", используемый в контексте изобретения, указывает на то, что допустимы некоторые несоответствия в антисмысловой последовательности, при условии достижения функциональности, т.е. перенацеливания сплайсинга. Предпочтительно, комплементарность составляет от 90% до 100%. Как правило, это допускает 1 или 2 несоответствия в AON из 20 нуклеотидов или 1, 2, 3 или 4 несоответствий в AON из 40 нуклеотидов, или 1, 2, 3, 4, 5 или 6 несоответствий в AON из 60 нуклеотидов и т.д. Необязательно, указанный AON можно далее тестировать посредством трансфекции в клетки сетчатки пациентов. Области комплементарности предпочтительно конструируют так, чтобы при комбинировании они были специфичными к экзону в пре-мРНК. Такую специфичность можно создавать посредством различных длин комплементарных областей, поскольку она зависит от фактических последовательностей в других молекулах (пре-)мРНК в системе. Риск того, что AON

также способен гибридизоваться в одной или более другими молекулами пре-мРНК, снижается при увеличении размера АОН. Очевидно, что АОН, содержащие несоответствия в области комплементарности, но сохраняющие способность гибридизоваться и/или связываться с областью(ями)-мишенью в конкретной пре-мРНК, можно использовать в рамках изобретения. Однако предпочтительно по меньшей мере комплементарные части не содержат таких несоответствий, поскольку АОН, лишенные несоответствий в комплементарной части, как правило, имеют более высокую эффективность и более высокую специфичность, чем АОН, имеющие такие несоответствия в одной или более комплементарных областях. Полагают, что более высокая сила гибридизации (т.е. увеличение количества взаимодействий с противоположной цепью) способствует повышению эффективности процесса препятствования аппарату сплайсинга системы.

Термины "модулировать сплайсинг" и "перенацеливать сплайсинг" используют в настоящем описании взаимозаменяемо, и они охватывают модулирующую сплайсинг терапию на основе АОН, направленную на мутацию с.768G>Т. Термин "перенацеливание сплайсинга" определяют в настоящем описании как перенацеливание сплайсинга пре-мРНК ABCA4 с получением исходного транскрипта.

АОН в соответствии с изобретением предпочтительно не содержит участок CpG, более предпочтительно не содержит никаких CpG. Присутствие CpG или участка CpG в олигонуклеотиде обычно ассоциировано с увеличенной иммуногенностью указанного олигонуклеотида (Dorn and Kippenberger, 2008). Эта увеличенная иммуногенность является нежелательной, поскольку она может индуцировать повреждение ткани, подвергаемой лечению, т.е. глаза. Иммуногенность можно оценивать в модели на животных посредством оценки присутствия CD4+ и/или CD8+ клеток и/или инфильтрации воспалительных мононуклеоцитов. Иммуногенность также можно оценивать в крови животного или человека, которому проводили лечение АОН в соответствии с изобретением, посредством детекции присутствия нейтрализующего антитела и/или антитела, распознающего указанный АОН, с использованием стандартного иммуноанализа, известного специалисту в данной области. Воспалительную реакцию, продуцирование интерферонов, подобных типу I, продуцирование IL-12 и/или повышение иммуногенности можно оценивать посредством детекции присутствия или повышения количества нейтрализующего антитела или антитела, распознающего указанный АОН, с использованием стандартного иммуноанализа. Более предпочтительно, АОН в соответствии с изобретением, имеет приемлемую кинетику связывания РНК и/или термодинамические свойства. Кинетика связывания РНК и/или термодинамические свойства по меньшей мере частично определяются температурой плавления олигонуклеотида (T_m ; вычисляемая с использованием калькулятора свойств олигонуклеотидов (www.unc.edu/~cail/bioutil/oligo/index) для одноцепочечной РНК с использованием базовой T_m и модели ближайшего соседа), и/или свободной энергией комплекса АОН-экзон-мишень (с использованием RNA structure версии 4.5). Если T_m

является слишком высокой, то ожидается, что AON будет менее специфическим. Приемлемая T_m и свободная энергия зависят от последовательности AON. Таким образом, трудно дать предпочтительные диапазоны для каждого из этих параметров. Приемлемая T_m может находиться в диапазоне от 35 и 70°C и приемлемая свободная энергия может находиться в диапазоне от 15 до 45 ккал/моль.

Во всех вариантах осуществления нуклеотид в антисмысловом олигонуклеотиде по изобретению может представлять собой остаток РНК, остаток ДНК или нуклеотидный аналог или эквивалент.

Предпочтительный AON для перенацеливания сплайсинга по изобретению имеет длину от приблизительно 8 до приблизительно 40 нуклеотидов, предпочтительно от приблизительно 10 до приблизительно 40 нуклеотидов, более предпочтительно от приблизительно 14 до приблизительно 30 нуклеотидов, более предпочтительно от приблизительно 16 до приблизительно 24 нуклеотидов, как например, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 или 24 нуклеотида. Предпочтительно, AON согласно изобретению имеет длину по меньшей мере 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 или 40 нуклеотидов.

В предпочтительном варианте осуществления AON для перенацеливания сплайсинга согласно изобретению содержит или состоит из SEQ ID NO: 34, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 73, 75 или 77. Было обнаружено, что эти AON были очень эффективными в отношении перенацеливания аберрантного сплайсинга ABCA4, вызываемого мутацией с.768G>T. Эти предпочтительные AON предпочтительно содержат от приблизительно 8 до приблизительно 40 нуклеотидов, предпочтительно от приблизительно 10 до приблизительно 40 нуклеотидов, более предпочтительно от приблизительно 14 до приблизительно 30 нуклеотидов, более предпочтительно от приблизительно 16 до приблизительно 24 нуклеотидов, как например, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 или 24 нуклеотидов, или предпочтительно содержат или состоят из по меньшей мере 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 или 40 нуклеотидов.

Предпочтительно, чтобы AON для перенацеливания сплайсинга согласно изобретению содержал один или более остатков, модифицированных для повышения устойчивости к нуклеазам, и/или для повышения аффинности антисмыслового олигонуклеотида к последовательности-мишени. Таким образом, в предпочтительном варианте осуществления AON содержит по меньшей мере один нуклеотидный аналог или эквивалент, где нуклеотидный аналог или эквивалент определяют как остаток, имеющий модифицированное основание, и/или модифицированный остов, и/или неприродную межнуклеозидную связь, или комбинацию этих модификаций.

В предпочтительном варианте осуществления нуклеотидный аналог или эквивалент содержит модифицированный остов. Примерами таких остовов являются остовы морфолино, карбаматные остовы, силоксановые остовы, сульфидные, сульфоксидные и сульфоновые остовы, формацетильные и тиоформацетильные остовы,

метиленформацетильные остовы, рибоацетильные остовы, алкенсодержащие остовы, сульфаматные, сульфонатные и сульфонамидные остовы, остовы метиленимино и метиленгидразино и амидные остовы. Фосфородиамидатные морфолиноолигомеры представляют собой олигонуклеотиды с модифицированным остовом, которые ранее были исследованы в качестве антисмысловых агентов.

Морфолиноолигонуклеотиды имеют незаряженный остов, в котором дезоксирибозный сахар ДНК заменен шестичленным кольцом и фосфодиэфирная связь заменена фосфородиамидатной связью. Морфолиноолигонуклеотиды являются устойчивыми к ферментативной деградации и, по-видимому, функционируют в качестве антисмысловых агентов посредством остановки трансляции или препятствования сплайсингу пре-мРНК, а не посредством активации РНК-азы Н. Морфолиноолигонуклеотиды успешно доставляют в клетки тканевой культуры способами, которые физически нарушают клеточную мембрану, и в одном исследовании, сравнивавшем несколько таких способов, было обнаружено, что нагрузка при соскабливании является наиболее эффективным способом доставки; однако, поскольку остов морфолино является незаряженным, катонные липиды не являются эффективными медиаторами поглощения морфолиноолигонуклеотидов клетками. В недавнем сообщении было продемонстрировано образование триплекса посредством морфолиноолигонуклеотида и, как показали эти исследования, вследствие неионного остова, морфолиноолигонуклеотид был способен к образованию триплекса в отсутствие магния.

Кроме того, предпочтительно, чтобы связь между остатками в остове не включала атом фосфора, такая как связь, которая образована короткоцепочечными алкильными или циклоалкильными межнуклеозидными связями, смешанными межнуклеозидными связями из гетероатома алкила или циклоалкила, или одной или более короткоцепочечными гетероатомными или гетероциклическими межнуклеозидными связями.

Предпочтительный нуклеотидный аналог или эквивалент включает пептидно-нуклеиновую кислоту (PNA), имеющую модифицированный полиамидный остов (Nielsen et al., 1991). Молекулы на основе PNA являются истинными миметиками молекул ДНК с точки зрения распознавания пар оснований. Остов PNA состоит из элементов N-(2-аминоэтил)глицина, связанных пептидными связями, где нуклеиновые основания связаны с остовом посредством метиленкарбонильных связей. Альтернативный остов включает одноуглеродный удлиненный пирролидиновый мономер PNA (Govindaraju and Kumar, 2005). Поскольку остов молекулы PNA не содержит заряженных фосфатных групп, гибриды PNA-РНК обычно более стабильны, чем гибриды РНК-РНК или РНК-ДНК, соответственно (Egholm et al., 1993). Следующий предпочтительный остов включает морфолинонуклеотидный аналог или эквивалент, в котором рибозный или дезоксирибозный сахар заменен 6-членным морфолинокольцом. Наиболее предпочтительный нуклеотидный аналог или эквивалент включает фосфородиамидатный морфолиноолигомер (PMO), в котором рибозный или дезоксирибозный сахар заменен 6-

членным морфолинокольцом, и анионная фосфодиэфирная связь между соседними морфолинокольцами заменена неионной фосфородиамидатной связью.

В следующем варианте осуществления нуклеотидный аналог или эквивалент согласно изобретению содержит замену одного из немостиковых атомов кислорода в фосфодиэфирной связи. Эта модификация несколько дестабилизирует спаривание оснований, но добавляет значительную резистентность к деградации нуклеазами. Предпочтительный нуклеотидный аналог или эквивалент включает фосфоротиоат, хиральный фосфоротиоат, фосфородитиоат, фосфотриэфир, аминоалкилфосфотриэфир, N-фосфонат, метил и другой алкилфосфонат, включая 3'-алкиленфосфонат, 5'-алкиленфосфонат и хиральный фосфонат, фосфинат, фосфорамидат, включая 3'-аминофосфорамидат и аминоалкилфосфорамидат, тионофосфорамидат, тионоалкилфосфонат, тионоалкилфосфотриэфир, селенофосфат или боранофосфат.

Следующий предпочтительный нуклеотидный аналог или эквивалент согласно изобретению содержит одну или более частей сахаров, которые являются моно- или дизамещенными в положении 2', 3' и/или 5', например, посредством -ОН; -F; замещенного или незамещенного линейного или разветвленного низшего (C1-C10) алкила, алкенила, алкинила, алкарила, аллила или аралкила, которые могут прерываться одним или более гетероатомами; O-, S- или N-алкила; O-, S- или N-алкенила; O-, S- или N-алкинила; O-, S- или N-аллила; O-алкил-O-алкила, -метокси, -аминопропокси, метоксиэтокси, диметиламинооксиэтокси и -диметиламиноэтоксиэтокси. Сахарная часть может представлять собой пиранозу или ее производное, или дезоксипиранозу или ее производное, предпочтительно рибозу или ее производное, или дезоксирибозу или ее производное. Предпочтительная дериватизированная сахарная часть включает закрытую нуклеиновую кислоту (LNA), в которой 2'-атом углерода связан с 3'- или 4'-атомом углерода сахарного кольца, тем самым образуя бициклическую сахарную часть. Предпочтительная LNA включает 2'-O, 4'-C-этилен-мостиковую нуклеиновую кислоту (Morita et al., 2001). Эти замещения обеспечивают резистентность нуклеотидного аналога или эквивалента к РНК-азе H и нуклеазе и повышают аффинность РНК-мишени.

В другом варианте осуществления нуклеотидный аналог или эквивалент согласно изобретению содержит одно или более модификаций или замен оснований. Модифицированные основания включают синтетические и природные основания, такие как инозин, ксантин, гипоксантин и другие аза-, деаза-, гидрокси-, галоген-, тио-, тиол-, алкил-, алкенил-, алкинил-, тиоалкил-производные пиримидиновых и пуриновых оснований, которые известны или будут известны в данной области.

Специалисту в данной области понятно, что не является необходимым, чтобы все положения в AON были модифицированы единообразно. Кроме того, более одного из вышеупомянутых аналогов или эквивалентов может быть включено в один AON или даже в одном положении в AON. В определенных вариантах осуществления AON согласно изобретению имеет по меньшей мере два различных типа аналогов или эквивалентов.

Таким образом, в предпочтительном варианте осуществления антисмысловой

олигонуклеотид для перенацеливания сплайсинга согласно изобретению включает 2'-О алкилфосфороотиатный антисмысловый олигонуклеотид, такой как 2'-О-метил-модифицированная рибоза (РНК), 2'-О-этил-модифицированная рибоза, 2'-О-метоксиэтил-модифицированная рибоза, 2'-О-пропил-модифицированная рибоза и/или замещенные производные этих модификаций, такие как галогенированные производные.

В предпочтительном варианте осуществления AON для перенацеливания сплайсинга согласно изобретению содержит или состоит из SEQ ID NO: 34, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 73, 75 или 77, и содержит 2'-О-метил-модифицированную рибозу (РНК) и фосфороотиатный остов. В другом предпочтительном варианте осуществления AON для перенацеливания сплайсинга согласно изобретению содержит или состоит из SEQ ID NO: 34, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 73, 75 или 77, и содержит 2'-О-метоксиэтил-модифицированную рибозу (РНК) и фосфороотиатный остов.

В одном варианте осуществления AON для перенацеливания сплайсинга согласно изобретению содержит или состоит из SEQ ID NO: 6, и содержит 2'-О-метил-модифицированную рибозу (РНК) или 2'-О-метоксиэтил-модифицированную рибозу (РНК) и фосфороотиатный остов.

В одном варианте осуществления AON для перенацеливания сплайсинга согласно изобретению содержит или состоит из SEQ ID NO: 10, и содержит 2'-О-метил-модифицированную рибозу (РНК) или 2'-О-метоксиэтил-модифицированную рибозу (РНК) и фосфороотиатный остов.

В одном варианте осуществления AON для перенацеливания сплайсинга согласно изобретению содержит или состоит из SEQ ID NO: 14, и содержит 2'-О-метил-модифицированную рибозу (РНК) или 2'-О-метоксиэтил-модифицированную рибозу (РНК) и фосфороотиатный остов.

В одном варианте осуществления AON для перенацеливания сплайсинга согласно изобретению содержит или состоит из SEQ ID NO: 18, и содержит 2'-О-метил-модифицированную рибозу (РНК) или 2'-О-метоксиэтил-модифицированную рибозу (РНК) и фосфороотиатный остов.

В одном варианте осуществления AON для перенацеливания сплайсинга согласно изобретению содержит или состоит из SEQ ID NO: 22, и содержит 2'-О-метил-модифицированную рибозу (РНК) или 2'-О-метоксиэтил-модифицированную рибозу (РНК) и фосфороотиатный остов.

В одном варианте осуществления AON для перенацеливания сплайсинга согласно изобретению содержит или состоит из SEQ ID NO: 26, и содержит 2'-О-метил-модифицированную рибозу (РНК) или 2'-О-метоксиэтил-модифицированную рибозу (РНК) и фосфороотиатный остов.

В одном варианте осуществления AON для перенацеливания сплайсинга согласно изобретению содержит или состоит из SEQ ID NO: 30, и содержит 2'-О-метил-модифицированную рибозу (РНК) или 2'-О-метоксиэтил-модифицированную рибозу (РНК) и фосфороотиатный остов.

В одном варианте осуществления AON для перенацеливания сплайсинга согласно изобретению содержит или состоит из SEQ ID NO: 77, и содержит 2'-О-метил-модифицированную рибозу (РНК) или 2'-О-метоксиэтил-модифицированную рибозу (РНК) и фосфоротиоатный остов.

AON для перенацеливания сплайсинга согласно изобретению может быть введен непрямо с использованием подходящих средств, известных в данной области. Он может быть предоставлен, например, индивидууму или клетке, ткани или органу указанного индивидуума как есть, в качестве так называемого "голого" AON. Также он может быть введен в форме экспрессирующего вектора, где экспрессирующий вектор кодирует РНК-транскрипт, содержащий последовательность указанного AON согласно изобретению. Экспрессирующий вектор предпочтительно вводят в клетку, ткань, орган или индивидууму посредством носителя для доставки генов. В предпочтительном варианте осуществления предусматривается экспрессирующий вектор на основе вируса, содержащий экспрессирующую кассету или транскрипционную кассету, которая обеспечивает экспрессию или транскрипцию AON для перенацеливания сплайсинга согласно изобретению. Таким образом, изобретение относится к вирусному вектору, экспрессирующему антисмысловой олигонуклеотид для перенацеливания сплайсинга согласно изобретению, когда он помещен в условия, способствующие экспрессии молекулы.

AON для перенацеливания сплайсинга согласно изобретению может быть предоставлен клетке посредством экспрессии происходящего из плазмиды антисмыслового олигонуклеотида или вирусной экспрессии, обеспечиваемой векторами на основе аденовируса или аденоассоциированного вируса. Экспрессия может контролироваться промотором РНК-полимеразы II (Pol II), таким как промотор РНК U7 или промотор РНК-полимеразы III (Pol III), такой как промотор РНК U6. Предпочтительным носителем для доставки является вирусный вектор, такой как вектор на основе аденоассоциированного вируса (AAV) или ретровирусный вектор, такой как лентивирусный вектор и т.п. Также для доставки AON для перенацеливания сплайсинга согласно изобретению можно использовать плазмиды, искусственные хромосомы, плазмиды, пригодные для направленной гомологичной рекомбинации и встраивания в геном клеток человека. Предпочтительными в рамках изобретения являются векторы, где транскрипция запускается с промоторов PolIII, и/или где транскрипты имеют форму слитых конструкций с транскриптами U1 или U7, что обеспечивает хорошие результаты для доставки небольших транскриптов. Специалист в данной области способен конструировать подходящие транскрипты. Предпочтительными являются транскрипты, контролируемые PolIII, предпочтительно, в форме слитого транскрипта с транскриптом U1 или U7. Такие слитые конструкции можно получать, как описано ранее (Gorman et al., 1998).

Предпочтительной экспрессирующей системой для AON для перенацеливания сплайсинга согласно изобретению является вектор на основе аденоассоциированного

вируса (AAV). Были разработаны одноцепочечные и двухцепочечные векторы на основе AAV, которые могут использоваться для длительной экспрессии антисмысловых нуклеотидных последовательностей для высокоэффективного перенацеливания сплайсинга. Предпочтительный вектор на основе AAV, например, содержит экспрессирующую кассету, которая контролируется промотором РНК-полимеразы III (Pol III) или промотором РНК-полимеразы II (Pol II). Предпочтительным РНК-промотором является, например, промотор РНК U6 Pol III, или промотор РНК U7 Pol II.

Таким образом, изобретение относится к вектору на основе вируса, содержащему контролируемую промотором Pol II или Pol III экспрессирующую кассету для экспрессии AON для перенацеливания сплайсинга согласно изобретению.

Вектор на основе AAV согласно изобретению представляет собой рекомбинантный вектор на основе AAV, и он относится к вектору на основе AAV, содержащему часть генома AAV, содержащую кодируемый AON для перенацеливания сплайсинга согласно изобретению, инкапсидированный в белковую оболочку капсидного белка, происходящего из серотипа AAV, как описано в настоящем описании. Часть генома AAV может содержать инвертированные концевые повторы (ITR), происходящие из серотипа аденоассоциированного вируса, такого как AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV8, AAV9 и другие. Белковая оболочка, состоящая из капсидного белка, может происходить из серотипа AAV, такого как AAV1, 2, 3, 4, 5, 8, 9 и другие. Белковая оболочка также может быть названа капсидной белковой оболочкой. В векторе на основе AAV может быть удален один или предпочтительно все гены AAV дикого типа, однако он все еще может содержать функциональные последовательности нуклеиновых кислот ITR. Функциональные последовательности ITR необходимы для репликации, спасения и упаковывания вирионов AAV. Последовательности ITR могут представлять собой последовательности дикого типа или могут обладать по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95 или 100% идентичностью последовательности с последовательностями дикого типа, или могут быть изменены, например, посредством инсерции, мутации, делеции или замены нуклеотидов при условии, что они остаются функциональными. В этом контексте функциональность относится к способности обеспечивать упаковывание генома в капсидную оболочку, а затем позволять экспрессию в клетке-хозяине, подлежащей инфицированию, или клетке-мишени. В контексте изобретения капсидная белковая оболочка может происходить из отличного серотипа от ITR генома вектора на основе AAV. Таким образом, вектор на основе AAV согласно настоящему изобретению может состоять из капсидной белковой оболочки, т.е. икосаэдрального капсида, который содержит капсидные белки (VP1, VP2, и/или VP3) одного серотипа AAV, например, серотипа 2 AAV, в то время как последовательности ITR, находящиеся в этом векторе на основе AAV5, могут происходить из любых серотипов AAV, описанных выше, включая вектор на основе AAV2. Таким образом, "вектор на основе AAV2" включает капсидную белковую оболочку AAV серотипа 2, в то время как, например, "вектор на основе AAV5" содержит капсидную белковую оболочку AAV серотипа 5, причем любой из них может

инкапсидировать любой из ITR геномов векторов на основе AAV согласно изобретению.

Предпочтительно, рекомбинантный вектор на основе AAV согласно изобретению содержит капсидную белковую оболочку AAV серотипа 2, 5, 8 или AAV серотипа 9, где геном AAV или ITR, присутствующие в указанном векторе AAV, происходят из AAV серотипа 2, 5, 8 или AAV серотипа 9; такой вектор на основе AAV обозначают в настоящем описании как вектор AAV2/2, AAV 2/5, AAV2/8, AAV2/9, AAV5/2, AAV5/5, AAV5/8, AAV 5/9, AAV8/2, AAV 8/5, AAV8/8, AAV8/9, AAV9/2, AAV9/5, AAV9/8 или AAV9/9.

Более предпочтительно, рекомбинантный вектор на основе AAV согласно изобретению содержит капсидную белковую оболочку AAV серотипа 2, и геном AAV или ITR, присутствующие в указанном векторе, происходят из AAV серотипа 5; такой вектор обозначают как вектор AAV 2/5.

Более предпочтительно, рекомбинантный вектор на основе AAV согласно изобретению содержит капсидную белковую оболочку AAV серотипа 2, и геном AAV или ITR, присутствующие в указанном векторе, происходят из AAV серотипа 8; такой вектор обозначают как вектор AAV 2/8.

Более предпочтительно, рекомбинантный вектор на основе AAV согласно изобретению содержит капсидную белковую оболочку AAV серотипа 2, и геном AAV или ITR, присутствующие в указанном векторе, происходят из AAV серотипа 9; такой вектор обозначают как вектор AAV 2/9.

Более предпочтительно, рекомбинантный вектор на основе AAV согласно изобретению содержит капсидную белковую оболочку AAV серотипа 2, и геном AAV или ITR, присутствующие в указанном векторе, происходят из AAV серотипа 2; такой вектор обозначают как вектор AAV 2/2.

Молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую AON для перенацеливания сплайсинга согласно изобретению, соответствующую предпочтительной для выбора последовательности нуклеиновой кислоты, предпочтительно встраивают между геномом AAV или последовательностями ITR, как указано выше, например, экспрессирующей конструкцией, содержащей регулирующий экспрессию элемент, функционально связанный с кодирующей последовательностью и 3'-терминирующей последовательностью.

"Функции помощника AAV", как правило, относятся к соответствующим функциям AAV, требуемым для репликации и упаковывания AAV, предоставляемым вектору на основе AAV в транс-формате. Функции помощника AAV дополняют функции AAV, которые отсутствуют в векторе AAV, но они не включают ITR AAV (которые предоставляются геномом вектора на основе AAV). Функции помощника AAV включают две основных ORF AAV, а именно, кодирующую область гер и кодирующую область сар или функциональные по существу идентичные им последовательности. Области Rep и Cap хорошо известны в данной области, см., например, (Chiorini et al., 1999) или US 5139941, включенные в настоящее описание в качестве ссылок. Функции помощника AAV

могут быть предоставлены на конструкции помощника AAV, которая может представлять собой плазмиду. Ведение конструкции помощника в клетку-хозяина может происходить, например, посредством трансформации, трансфекции или трансдукции до или одновременно с введением генома AAV, присутствующего в векторе AAV, как описано в настоящем описании. Таким образом, конструкции помощников AAV согласно изобретению могут быть выбраны таким образом, чтобы они обеспечивали требуемую комбинацию серотипов для капсидной белковой оболочки вектора AAV с одной стороны и для репликации и упаковывания генома AAV, присутствующего в указанном векторе на основе AAV, с другой стороны.

"Вирус-помощник AAV" обеспечивает дополнительные функции, требуемые для репликации и упаковывания AAV. Походящие вирусы-помощники AAV включают аденовирусы, вирусы простого герпеса (такие как HSV типа 1 и 2) и вирусы коровьей оспы. Дополнительные функции, обеспечиваемые вирусом-помощником, могут быть внесены в клетку-хозяина посредством векторов, как описано в US 6531456, включенной в настоящее описание в качестве ссылки.

Предпочтительно, геном AAV, присутствующий в рекомбинантном векторе на основе AAV согласно изобретению, не содержит никаких нуклеотидных последовательностей, кодирующих вирусные белки, таких как гены *her* (репликация) или *cap* (капсид) AAV. Геном AAV, кроме того, может включать маркерный или репортерный ген, такой как ген, например, кодирующий устойчивость к антибиотику, флуоресцентный белок (например, *gfp*), или ген, кодирующий химически, ферментативно или иным образом поддающийся детекции и/или селекции продукт (например, *lacZ*, *aph* и т.д.), известный в данной области.

Предпочтительно, вектор на основе AAV согласно изобретению конструируют и продуцируют способом согласно Garanto et al., 2016, которая включена в настоящее описание в качестве ссылки.

Предпочтительным вектором на основе AAV согласно изобретению является вектор на основе AAV, предпочтительно вектор AAV2/5, AAV2/8, AAV2/9 или AAV2/2, экспрессирующий AON для перенацеливания сплайсинга согласно изобретению, т.е. AON, который содержит или предпочтительно состоит из последовательности, которая:

комплементарна или по существу комплементарна нуклеотидной последовательности, состоящей из SEQ ID NO: 4, предпочтительно AON комплементарен полинуклеотиду с SEQ ID NO: 5, более предпочтительно AON комплементарен полинуклеотиду с SEQ ID NO: 80, еще более предпочтительно комплементарен или по существу комплементарен полинуклеотиду с нуклеотидной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 7, 8, 9; 11, 12, 13; 15, 16, 17; 19, 20 и 21. Еще более предпочтительно, AON содержит или состоит из полинуклеотида с нуклеотидной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 26, и SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 51,

SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 54, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 56, SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 72, SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 74, SEQ ID NO: 75, SEQ ID NO: 76, SEQ ID NO: 77, или наиболее предпочтительно выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 34, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 73, 75 и 77.

Ожидаются усовершенствования средств предоставления индивидууму, или клетке, ткани, органу указанного индивидуума AON для перенацеливания сплайсинга согласно изобретению, учитывая прогресс, который уже достигнут к настоящему времени. Такие будущие усовершенствования, безусловно, могут охватываться для достижения упомянутого эффекта на реструктурирование мРНК с использованием способа согласно изобретению. AON для перенацеливания сплайсинга согласно изобретению может быть доставлен как есть в качестве "голого" AON индивидууму, в клетку, ткань или орган указанного индивидуума. При ведении AON для перенацеливания сплайсинга согласно изобретению предпочтительно, чтобы молекула была растворена в растворе, который совместим со способом доставки. Клеткам сетчатки может быть предоставлена плазида для антисмысловой экспрессии олигонуклеотида посредством предоставления плазмиды в водном растворе.

Альтернативно предпочтительным способом доставки AON для перенацеливания сплайсинга или плазмиды для экспрессии такого AON является вирусный вектор или наночастицы. Предпочтительно, вирусные векторы или наночастицы доставляют в клетки сетчатки или другие соответствующие клетки. Такая доставка в клетки сетчатки или другие соответствующие клетки может происходить *in vivo*, *in vitro* или *ex vivo*; см., например, Garanto et al, 2016, которая включена в настоящее описание в качестве ссылки.

Альтернативно плазида может быть предоставлена посредством трансфекции с использованием известных агентов трансфекции. Для внутривенного, подкожного, внутримышечного, интратекального и/или внутрижелудочкового введения предпочтительно, чтобы раствор представлял собой физиологический солевой раствор. Особенно предпочтительным в рамках изобретения является использование эксципиента или агентов трансфекции, которые способствуют доставке каждого из компонентов, как определено в настоящем описании, к клетке и/или в клетку, предпочтительно в клетку сетчатки. Предпочтительными являются эксципиенты или агенты трансфекции, способные образовывать комплексы, наночастицы, мицеллы, везикулы и/или липосомы, которые доставляют каждый компонент, как определено в настоящем описании, в комплексе с или заключенным в везикулу или липосому, через клеточную мембрану. Многие из этих эксципиентов известны в данной области. Подходящие эксципиенты или агенты трансфекции включают полиэтиленимин (PEI; ExGen500 (MBI Fermentas)), Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen) или их производные, или сходные катионные полимеры, включая сополимеры полипропиленimina или полиэтиленимина (PEC) и производные,

синтетические амфифилы (SAINT-18), Lipofectin™, DOTAP и/или вирусные капсидные белки, которые способны к самосборке в частицы, которые могут доставлять каждый компонент, как определено в настоящем описании, в клетку, предпочтительно клетку сетчатки. Было показано, что такие эксципиенты эффективно доставляют олигонуклеотид, такой как AON, в широкое множество культивируемых клеток, включая клетки сетчатки. Их высокий потенциал к трансфекции комбинируется с ожидаемой низкой или умеренной токсичностью с точки зрения общей выживаемости клеток. Эту простоту структурной модификации можно использовать, чтобы позволить дальнейшие модификации и анализ их дальнейших (*in vivo*) характеристик переноса нуклеиновых кислот и токсичности.

Липофектин является примером липосомального агента трансфекции. Он состоит из двух липидных компонентов, катионного липида хлорида N-[1-(2,3-диолеилокси)пропил]-N, N, N-триметиламмония (DOTMA) (а также для сравнения DOTAP, который является метилсульфатной солью) и нейтрального липида диолеилфосфатидилэтаноламина (DOPE). Нейтральный компонент опосредует внутриклеточное высвобождение. Другой группой систем доставки являются полимерные наночастицы.

Поликатионы, такие как диэтиламиноэтиламиноэтил (DEAE)-декстран, которые хорошо известны в качестве реагентов для трансфекции ДНК, можно комбинировать с бутилцианоакрилатом (BCSA) и гексилцианоакрилатом (HCSA) для составления катионных наночастиц, которые доставляют каждый из компонентов, как определено в настоящем описании, предпочтительно AON согласно изобретению, через клеточные мембраны в клетки.

В дополнение к этим распространенным материалам в форме наночастиц, катионный пептид протамин обеспечивает альтернативный подход к составлению олигонуклеотида с коллоидами. Эта коллоидная система наночастиц может образовывать так называемые протиклы (*proticle*), которые могут быть получены просто посредством процесса самосборки, для упаковывания и опосредования внутриклеточного высвобождения олигонуклеотида. Квалифицированный специалист может выбрать и адаптировать любые из описанных выше или другие коммерчески доступные альтернативные эксципиенты и системы доставки для упаковывания и доставки сохраняющей экзон молекулы для применения в рамках настоящего изобретения для доставки ее для предупреждения, лечения или отсрочивания связанного с ABCA4 заболевания или состояния. "Предупреждение, лечение или отсрочивание связанного с ABCA4 заболевания или состояния" предпочтительно определяют в настоящем описании как предупреждение, остановку, прекращение прогрессирования или обращение вспять частичного или полного снижения остроты зрения или слепоты, вызываемых генетическим дефектом в гене ABCA4.

Кроме того, AON для перенацеливания сплайсинга согласно изобретению может быть ковалентно или нековалентно связан с нацеливающим лигандом, специфически сконструированным для облегчения захвата в клетку, цитоплазму и/или ее ядро. Такой

лиганд может содержать (i) соединение (включая, но не ограничиваясь ими, пептид(-подобные) структуры), распознающее определенные элементы клетки, ткани или органа, способствующее поглощению клеткой, и/или (ii) химическое соединение, способное способствовать поглощению клетками и/или внутриклеточному высвобождению олигонуклеотида из везикул, например, эндосом или лизосом.

Таким образом, в предпочтительном варианте осуществления AON для перенацеливания сплайсинга согласно изобретению составлен в виде композиции или лекарственного средства, или композиции, которая содержит по меньшей мере эксципиент и/или нацеливающий лиганд для доставки, и/или устройство для его доставки в клетку и/или усиления его внутриклеточной доставки.

Следует понимать, что, если композиция содержит дополнительный компонент, такой как вспомогательное соединение, как определено в настоящем описании ниже, каждый компонент композиции в подходящем случае может не быть составлен в виде одной комбинации, или композиции, или препарата. В зависимости их от типа и конкретных признаков, специалист в данной области знает, какой тип состава является наиболее подходящим для каждого компонента, как определено в настоящем описании. В предпочтительном варианте осуществления изобретение относится к композиции или препарату, которые имеют форму набора, содержащего AON для перенацеливания сплайсинга согласно изобретению и дополнительное вспомогательное соединение, как определено в настоящем описании ниже.

Если необходимо и/или желательно, AON для перенацеливания сплайсинга согласно изобретению или вектор, предпочтительно вирусный вектор, согласно изобретению, экспрессирующий AON для перенацеливания сплайсинга согласно изобретению, может быть включен в фармацевтически активную смесь посредством добавления фармацевтически приемлемого носителя.

Таким образом, изобретение также относится к композиции, предпочтительно фармацевтической композиции, содержащей антисмысловой олигонуклеотид для перенацеливания сплайсинга согласно изобретению или вирусный вектор согласно изобретению и фармацевтически приемлемый эксципиент. Такая композиция может содержать один AON для перенацеливания сплайсинга или вирусный вектор согласно изобретению, но также она может содержать множество различных AON для перенацеливания сплайсинга или вирусных векторов согласно изобретению. Такая фармацевтическая композиция может содержать любой фармацевтически приемлемый эксципиент, включая носитель, наполнитель, консервант, адъювант, солюбилизатор и/или разбавитель. Такой фармацевтически приемлемый носитель, наполнитель, консервант, адъювант, солюбилизатор и/или разбавитель может быть найден, например, в Remington, 2000. каждый признак указанной композиции определен в настоящем описании ранее.

Предпочтительным путем введения является введение посредством интравитреальной инъекции водного раствора или специально адаптированного состава для внутриглазного введения. В EP2425 814 описана эмульсия типа "масло в воде", в

частности, адаптированная для внутриглазного (интравитреального) введения лекарственных средств на основе пептидов или нуклеиновых кислот. Эта эмульсия является менее плотной, чем жидкость стекловидного тела, так что эмульсия находится на поверхности стекловидного тела, избегая нарушения инъекцированным лекарственным средством зрения. Таким образом, в одном варианте осуществления предусматривается фармацевтическая композиция, пригодная для интравитреального введения и дозируемая в количестве в диапазоне от 0,01 до 20 мг/кг, предпочтительно от 0,05 до 20 мг/кг общего количества антисмысловых олигонуклеотидов на глаз. Предусматривается подходящая интравитреальная доза, и она включает от 0,05 мг до 5 мг, предпочтительно от 0,1 до 1 мг общего количества антисмысловых олигонуклеотидов на глаз, например, приблизительно: 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9 или 1,0 мг на глаз.

Предпочтительный АОН для перенацеливания сплайсинга согласно изобретению предназначен для лечения связанного с ABCA4 заболевания или состояния индивидуума. Во всех вариантах осуществления изобретения под термином "лечение" подразумевают предупреждение и/или замедление связанного с ABCA4 заболевания или состояния. У индивидуума, которого можно лечить с использованием АОН для перенацеливания сплайсинга согласно изобретению, может быть уже диагностировано наличие связанного с ABCA4 заболевания или состояния.

Альтернативно у индивидуума, которого можно лечить с использованием АОН для перенацеливания сплайсинга согласно изобретению, может еще не быть диагностировано наличие связанного с ABCA4 заболевания или состояния, но он может представлять собой индивидуума, имеющего повышенный риск развития связанного с ABCA4 заболевания или состояния в будущем, учитывая его или ее наследственность. Предпочтительным индивидуумом является человек. Во всех вариантах осуществления связанное с ABCA4 заболевание или состояние предпочтительно представляет собой болезнь Штаргардта.

Таким образом, изобретение, кроме того, относится к антисмысловому олигонуклеотиду для перенацеливания сплайсинга согласно изобретению, или вирусному вектору согласно изобретению, или (фармацевтической) композиции согласно изобретению для применения в качестве лекарственного средства, предпочтительно в качестве лекарственного средства для лечения связанного с ABCA4 заболевания или состояния, требующего модулирования сплайсинга ABCA4, и для применения в качестве лекарственного средства для предупреждения, лечения или замедления связанного с ABCA4 заболевания или состояния. Каждый признак всех вариантов осуществления медицинского применения в рамках настоящего изобретения ранее определен в настоящем описании, и предпочтительно он представляет собой такой признак, как ранее определено в настоящем описании.

Кроме того, изобретение относится к применению АОН для перенацеливания сплайсинга согласно изобретению, вектору согласно изобретению или (фармацевтической) композиции согласно изобретению для лечения связанного с ABCA4 заболевания или состояния, требующего модулирования сплайсинга ABCA4. Каждый

признак всех вариантов осуществления медицинского применения в рамках настоящего изобретения ранее определен в настоящем описании, и предпочтительно он представляет собой такой признак, как ранее определено в настоящем описании.

Кроме того, изобретение относится к способу лечения связанного с ABCA4 заболевания или состояния, требующего модулирования сплайсинга ABCA4, причем указанный способ включает приведение клетки указанного индивидуума в контакт с AON для перенацеливания сплайсинга согласно изобретению, вектором согласно изобретению или (фармацевтической) композицией согласно изобретению. Каждый признак всех вариантов осуществления медицинского применения в рамках настоящего изобретения ранее определен в настоящем описании, и предпочтительно он представляет собой такой признак, как ранее определено в настоящем описании.

Кроме того, изобретение относится к применению AON для перенацеливания сплайсинга согласно изобретению, вектора согласно изобретению или (фармацевтической) композиции согласно изобретению для получения лекарственного средства для лечения связанного с ABCA4 заболевания или состояния, требующего модулирования сплайсинга ABCA4. Каждый признак всех вариантов осуществления медицинского применения в рамках настоящего изобретения ранее определен в настоящем описании, и предпочтительно он представляет собой такой признак, как ранее определено в настоящем описании.

Кроме того, изобретение относится к антисмысловому олигонуклеотиду для перенацеливания сплайсинга согласно изобретению, применению согласно изобретению или способу согласно изобретению, где связанное с ABCA4 заболевание или состояние представляет собой болезнь Штаргардта.

Лечение в применении или в способе согласно изобретению предпочтительно проводят по меньшей мере один раз, и предпочтительно оно длится по меньшей мере одну неделю, один месяц, несколько месяцев, один год, 2, 3, 4, 5, 6 лет или более, например, пожизненно. Каждый AON для перенацеливания сплайсинга согласно изобретению или его эквивалент, как определено в настоящем описании, для применения в соответствии с изобретением может быть пригодным для прямого введения в клетку, ткань и/или орган *in vivo* индивидуумов, уже страдающих или имеющих риск развития связанного с ABCA4 заболевания или состояния, и ему можно проводить введение прямо *in vivo*, *ex vivo* или *in vitro*. Частота введения AON, композиции, соединения или вспомогательного соединения по изобретению может зависеть от нескольких параметров, таких как тяжесть заболевания, возраст пациента, мутация пациента, количество AON для перенацеливания сплайсинга согласно изобретению (т.е. доза), состав AON, композиции, соединения или вспомогательного соединения согласно изобретению, путь введения и т.д. Частота введения может варьироваться между введением раз в сутки, раз в неделю, по меньшей мере раз в две недели, или в три недели, или в четыре недели, или в пять недель, или в течение более длительного времени.

Диапазоны доз AON, композиции, соединения или вспомогательного соединения

согласно изобретению предпочтительно устанавливаются с помощью исследований с повышением дозы в клинических испытаниях (применение *in vivo*), для которых существуют строгие требования протокола. AON согласно изобретению можно использовать в дозе, которая находится в диапазоне от 0,01 до 20 мг/кг, предпочтительно от 0,05 до 20 мг/кг. Подходящая интравитреальная доза может составлять от 0,05 мг до 5 мг, предпочтительно от 0,1 до 1 мг на глаз, например, приблизительно 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9 или 1,0 мг на глаз.

В предпочтительном варианте осуществления используют концентрацию олигонуклеотида, как определено в настоящем описании, которая находится в диапазоне от 0,1 нМ до 1 мкМ. Предпочтительно, этот диапазон предназначен для применения *in vitro* в клеточной модели, такой как клетки сетчатки или ткань сетчатки. Более предпочтительно, используемая концентрация находится в диапазоне от 1 до 400 нМ, еще более предпочтительно от 10 до 200 нМ, еще более предпочтительно от 50 до 100 нМ. Если используют несколько отдельных AON, эта концентрация или доза может относиться к общей концентрации или дозе AON, или концентрации или дозе каждого добавленного AON.

В предпочтительном варианте осуществления вирусный вектор, предпочтительно вектор на основе AAV, как описано в настоящем описании ранее, в качестве носителя для доставки молекулы согласно изобретению вводят в дозе в диапазоне 1×10^9 - 1×10^{17} вирусных частиц на инъекцию, более предпочтительно 1×10^{10} - 1×10^{12} вирусных частиц на инъекцию.

Диапазоны концентрации или дозы AON, как описано выше, являются предпочтительными концентрациями или дозами для применений *in vivo*, *in vitro* или *ex vivo*. Специалисту в данной области будет понятно, что, в зависимости от используемых AON, клетки-мишени, на которую направлено лечение, гена-мишени и его уровней экспрессии, используемой среды и условий трансфекции и инкубации, концентрацию или дозу используемых AON можно далее варьировать и может потребоваться их дальнейшая оптимизация.

AON для перенацеливания сплайсинга согласно изобретению, или вирусный вектор согласно изобретению, или композицию согласно изобретению для применения в соответствии с изобретением можно вводить в клетку, ткань и/или орган *in vivo* индивидуумов, уже страдающих или имеющих риск развития связанного с ABCA4 заболевания или состояния, и их можно вводить *in vivo*, *ex vivo* или *in vitro*. AON для перенацеливания сплайсинга согласно изобретению, или вирусный вектор согласно изобретению, или композицию согласно изобретению можно вводить прямо или непрямо в клетку, ткань и/или орган *in vivo* индивидуума, уже страдающего или имеющего риск развития связанного с ABCA4 заболевания или состояния, и их можно вводить прямо или непрямо *in vivo*, *ex vivo* или *in vitro*. Поскольку болезнь Штаргардта имеет выраженный фенотип в клетках сетчатки, предпочтительно, чтобы указанные клетки-мишени представляли собой клетки сетчатки, кроме того, предпочтительно, чтобы указанная ткань

представляла собой сетчатку, и еще более предпочтительно, чтобы указанный орган включал или состоял из глаза.

Кроме того, изобретение относится к способу модулирования сплайсинга ABCA4 в клетке, причем указанный способ включает приведение клетки, предпочтительно клетки сетчатки, в контакт с антисмысловым олигонуклеотидом для перенацеливания сплайсинга согласно изобретению, вектором согласно изобретению или фармацевтической композицией согласно изобретению. Признаки этого аспекта предпочтительно представляют собой признаки, определенные в настоящем описании выше. Приведение клетки в контакт с AON для перенацеливания сплайсинга согласно изобретению, или вирусным вектором согласно изобретению, или композицией согласно изобретению можно проводить любым способом, известным специалисту в данной области. Предусматривается применение способов доставки AON для перенацеливания сплайсинга, вирусных векторов и композиций, как описано в настоящем описании выше. Приведение в контакт может быть осуществлено прямо или непрямо, и оно может происходить *in vivo*, *ex vivo* или *in vitro*.

Если нет иных указаний, каждый вариант осуществления, как описано в настоящем описании, можно комбинировать с другим вариантом осуществления, как описано в настоящем описании.

Определения

В этом документе и в его формуле изобретения глагол "включать" и его спряжения используют в неограничивающем значении для указания на то, что объекты после этого слова включены, но объекты, конкретно не указанные, не исключены. Кроме того, указание на элемент в форме единственного числа не исключает возможности того, что присутствует более одного элемента, если контекст явно не требует, чтобы присутствовал один и только один из элементов. Таким образом, форма единственного числа обычно означает "по меньшей мере один".

Слово "приблизительно" или "примерно", когда его используют совместно с числовой величиной (например, приблизительно 10) предпочтительно означает, что данная величина может представлять собой величину, большую или меньшую данной величины (10) на 5%.

Информацию о последовательностях, предоставленную в настоящем описании, не следует узко истолковывать как требование о включении ошибочно идентифицированных оснований. Специалист в данной области способен идентифицировать такие ошибочно идентифицированные основания, и ему известно, как корректировать такие ошибки. В случае ошибок последовательности, последовательность полипептида, получаемого посредством экспрессии гена, присутствующего SEQ ID NO: 1, содержащего последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую полипептид, является преимущественной.

Все патентные и литературные ссылки, цитированные в настоящем описании, включены в настоящее описание в качестве ссылок в полном объеме.

Описание чертежей

Фиг.1: А) Биоинформатическое прогнозирование силы донорного участка сплайсинга для исходного донорного участка сплайсинга экзона 6, и альтернативного донорного участка сплайсинга в интроне 6, как для случая дикого типа (верхняя последовательность), так и для мутанта с.768G>T (нижняя последовательность). Использование альтернативного участка сплайсинга в случае мутанта, согласно прогнозам, приводит к удлинению на 35 нуклеотидов (серым цветом, красным в цветной версии) транскрипта ABCA4. В) Анализ посредством ОТ-ПЦР ABCA4 на РНК, происходящей из фибробластов контрольного (ctrl). индивидуума, пациента с STGD1, гетерозиготного (comp. het.) по замене с.768G>T, и пациента с STGD1, гомозиготного (hom.) по мутации с.768G>T. - или+указывает на отсутствие или присутствие циклогексимида. М: маркер молекулярной массы из 100 п.н. MQ: вода milliQ.

Фиг.2: Схематическое представление положения варианта с.768G>T, исходного или альтернативного донорного участка сплайсинга, и относительное положение сконструированных AON.

Фиг.3: Анализ РНК гомозиготных по с.768G>T происходящих от пациента фибробластных клеток при доставке AON.

(А) Анализ транскрипта ABCA4 посредством ОТ-ПЦР и гнездовой ПЦР происходящих от пациента фибробластных клеток, обработанных AON2-AON8, или не подвергнутых обработке (NT). В качестве контроля использовали фибробластные клетки дикого типа (WT). В качестве нагрузочного контроля использовали АСТВ. MQ означает отрицательный контроль первой и второй (гнездовой) реакции ПЦР. AON1 дал сходные результаты с AON2 (данные не представлены).

(В) Хроматограммы полос, выделенных на геле 1-3. Полоса со звездочкой оказалось контаминацией, поскольку последовательность продемонстрировала только пик, соответствующий G, как в полосе 1, и пациент имеет гомозиготную мутацию с.768G>T. AON8 был способен корректировать сплайсинг, как показано посредством последовательности полосы 2.

Фиг.4: Положения AON по сравнению с областью-мишенью

Положение AON относительно области-мишени. AON 10-34 содержали модификацию 2'-ОМе с фосфоротиоатным (PS) остовом, в то время как AON 35-40 содержали модификацию 2'-О-МОЕ с фосфоротиоатным (PS) остовом. Экзонная часть обозначена серой рамкой. Мутация с.768G>T указана стрелкой и выделена полужирным шрифтом. Удлинение на 35 нуклеотидов, найденное для случаев STGD1, указано курсивом.

Фиг. 5: Скрининг AON в клетках HEK293T с использованием мидигена, содержащего вариант с.768T

Анализ посредством ОТ-ПЦР клеток HEK293T, совместно трансфицированных мидигеном, имеющим вариант с.768T (MUT), и либо AON (A#), либо смысловым олигонуклеотидом (SON) с модификацией 2'-ОМе с фосфоротиоатным (PS) остовом.

Мидиген дикого типа, содержащий с.768G (WT), использовали в качестве контроля. В качестве отрицательного контроля использовали нетрансфицированные клетки НЕК293Т (НЕК). MQ указывает на отрицательный контроль ПЦР. На нижней панели представлено полуколичественное определение соотношения (выраженного в процентах) между правильным (WT) и aberrантным (MUT) транскриптом для каждого условия.

Фиг.6: Скрининг 2'-О-МОЕ AON в клетках НЕК293Т

Анализ посредством ОТ-ПЦР клеток НЕК293Т, совместно трансфицированных с мутантным мидигеном (MUT) и несколькими AON (A#) или смысловым олигонуклеотидом (SON) с химической модификацией 2'-МОЕ и остовом PS. Мидиген дикого типа (WT) использовали в качестве положительного контроля, в то время как нетрансфицированные клетки (НЕК) использовали в качестве отрицательного контроля. Дорожка MQ соответствует отрицательному контролю ПЦР. Нижняя панель соответствует полуколичественному определению полос, выраженному в процентах правильного (WT) и aberrантного (MUT) транскрипта. Концентрация AON: 1 мкМ.

Фиг.7: Анализ эффективности AON в происходящих от пациента фибробластных клетках

Анализ эффективности нескольких AON (A#), химически модифицированного либо 2'-Оме, либо 2'-МОЕ, с остовом PS в происходящей от пациента фибробластной клеточной линии, гомозиготной имеющей вариант с.768G>T (НОМ). В качестве контроля (CON) использовали фибробласты, происходящие из здорового индивидуума. Поскольку aberrантный транскрипт подвержен нонсенс-опосредуемому распаду (NMD), как клетки CON, так и клетки НОМ культивировали в отсутствии (-) или в присутствии (+)циклогексимида (CHX). Все условия, вовлекающие доставку AON, выполняли в присутствии CHX. MQ указывает на отрицательный контроль ПЦР. АСТВ использовали в качестве нагрузочного контроля. Соотношение правильного (WT) и aberrантного (MUT) транскриптов в полуколичественном анализе выражали в процентах для каждого условия. AON концентрация: 1 мкМ.

Описание последовательностей

Таблица 1: Последовательности

SEQ ID NO:	Название
1	Последовательность геномной ДНК ABCA4
2	последовательность мРНК ABCA4
3	Белковая последовательность ABCA4
4	Последовательность экзона 6 ((± 75 п.о.)
5	Область-мишень в экзоне 6
6	AON1
7	Область-мишень AON1
8	Область-мишень AON1 +5

9	Область-мишень AON1 +10
10	AON2
11	Область-мишень AON2
12	Область-мишень AON2 +5
13	Область-мишень AON2 +10
14	AON3
15	Область-мишень AON3
16	Область-мишень AON3 +5
17	Область-мишень AON3 +10
18	AON4
19	Область-мишень AON4
20	Область-мишень AON4 +5
21	Область-мишень AON4 +10
22	AON5
23	Область-мишень AON5
24	Область-мишень AON5 +5
25	Область-мишень AON5 +10
26	AON6
27	Область-мишень AON6
28	Область-мишень AON6 +5
29	Область-мишень AON6 +10
30	AON7
31	Область-мишень AON7
32	Область-мишень AON7 +5
33	Область-мишень AON7 +10
34	AON8
35	Область-мишень AON8
36	Область-мишень AON8 +5
37	Область-мишень AON8 +10
38	Праймер exon4_Fw
39	Праймер Exon8_Rv
40	Праймер exon5_Fw
41	Праймер exon7_Rv
42	Последовательность ABCA4 дикого типа, представленная на фиг. 1А

43	Мутантная последовательность ABCA4, представленная на фиг.1А
44	Последовательность фрагмента полосы 1, представленная на фиг.3В
45	Последовательность фрагмента полосы 2, представленная на фиг.3В
46	Последовательность фрагмента полосы 3, представленная на фиг.3В
47	AON10
48	AON11
49	AON12
50	AON13
51	AON14
52	AON15
53	AON16
54	AON17
55	AON18
56	AON19
57	AON20
58	AON21
59	AON22
60	AON23
61	AON24
62	AON25
63	AON26
64	AON27
65	AON28
66	AON29
67	AON30
68	AON31
69	AON32
70	AON33
71	AON34
72	AON35
73	AON36
74	AON37
75	AON38
76	AON39

77	AON40
78	2'-OMe SON
79	2'-MOE SON
80	Мутантная последовательность ABCA4, представленная на фиг.4
81	Праймер ABCA4 ex6_Fw
82	Праймер pCI-Neo-Rho ex5_Rev
83	Праймер pCI-Neo-Rho ex5_Fw
84	Праймер pCI-Neo-Rho ex5_Rev
85	Праймер exon5_Fw
86	Праймер exon7_Rev
87	Праймер exon4_Fw
88	Праймер exon8_Rev
89	Праймер exon5_Fw
90	Праймер exon7_Re
91	Праймер P49750_Fw_ACTB exon 3
92	P49751_Rev_ACTB exon 4

Примеры

Повторная мутация в ABCA4, которая лежит в основе болезни Штаргардта (STGD1), представляет собой с.768G>T. Эта мутация заменяет последний нуклеотид экзона 6, но не изменяет аминокислотную последовательность, т.е. остаток валина, кодируемый соответствующим кодоном, остается валином (p.Val256Val). Вместо этого, сила донорного участка сплайсинга экзона 6 снижается посредством присутствия T вместо G (фиг.1А, фиг.4). В результате, аппаратом сплайсинга используется альтернативный участок сплайсинга на 35 нуклеотидов ниже в интроне 6, что приводит к удлинению экзона 6 на 35 нуклеотидов, как продемонстрировано в происходящих от пациента фибробластных клетках (фиг.1В). Поскольку этот транскрипт не обнаруживался в отсутствие циклогексимида - ингибитора нонсенс-опосредуемого распада - этот aberrantный транскрипт наиболее вероятно деградировал в клетке. Альтернативно трансляции мутантной РНК удлинение на 35 нуклеотидов вызывает сдвиг рамки считывания, который, как спрогнозировано, приводит к терминации синтеза белка.

Авторы изобретения оценили, может ли введение AON восстановить дефект сплайсинга, ассоциированный с мутацией с.768G>T в ABCA4, посредством конструирования AON, которые блокировали бы альтернативный донорный участок сплайсинга в интроне 6, тем самым намереваясь перенаправить аппарат сплайсинга обратно к исходному донорному участку сплайсинга.

Пример 1

Сначала в разделе "Материалы и способы" описаны экспериментальные детали, в

то время как результаты описаны и проиллюстрированы в разделе "Результаты" ниже.

Материалы и способы

Конструирование и тестирование AON

Для конструирования AON была выбрана меньшая представляющая интерес область размером 257 п.н. (SEQ ID NO: 5). Затем конструировали олигонуклеотиды длиной ~20 нуклеотидов. Все олигонуклеотиды подвергали прогнозированию структуры РНК *in silico*. Восемь AON, которые продемонстрировали различия в спрогнозированной структуре и/или имели наилучшую доступность, конструировали с различной химией и заказывали (см. таблица 2 и фиг.2).

Таблица 2: AON

AON#	SEQ ID NO:	Последовательность AON (5'->3')	Химическая модификации
AON1	6	ACCCCAGGAAUCACCUUGCA	2'-О-метил (2'-ОМе)
AON2	10	GCUCUGCUACCCCAGGAAUC	2'-Оме
AON3	14	CAAUUGGCGAGCAGCCAAA	Немодифицированный
AON4	18	AUCACCUUGCAAUUGGCGAG	Немодифицированный
AON5	22	GAGCAGCCAAACCCCUCCCU	Немодифицированный
AON6	26	UUGGCGAGCAGCCAAACCC	Немодифицированный
AON7	30	CUUGCAAUUGGCGAGCAGCC	Немодифицированный
AON8	34	GGAAUCACCUUGCAAUUGGC G	2'-ОМе и фосфоротиоатный остов

Тестирование AON

Получали биоптат кожи от пациента с STGD1, гомозиготного имеющего с.768G>T, и получали клеточную линию фибробластов. Затем клеточную линию фибробластов трансфицировали восемью различными AON (описанными в таблице 2) в присутствии циклогексимида. Затем трансфицированные клетки подвергали анализу с использованием ОТ-ПЦР.

Анализ с использованием ОТ-ПЦР

Тотальную РНК выделяли с использованием набора NucleoSpin RNA Clean-up Kit (каталожный номер № 740955-50; Macherey-Nagel, Дюрен, Германия) в соответствии с протоколом изготовителя. Проводили количественное определение РНК и кДНК синтезировали из 1 мкг РНК с использованием набора для синтеза кДНК iScript (каталожный номер № 1708891; Bio-Rad, Hercules, CA) в соответствии с инструкциями изготовителя. Наконец, эффективность AON оценивали посредством проведения гнездовой ПЦР с использованием следующих праймеров ABCA4: PCR1 (exon4_Fw: 5'-CACCCGGAGAGAATTGCAG-3' (SEQ ID NO: 38) и exon8_Rv: 5'-CCTGCATACTCGGCCGATG-3' (SEQ ID NO: 39)); PCR2 или nested ПЦР (exon5_Fw: 5'-GGAATACGAATAAGGGATATCTTG-3' (SEQ ID NO: 40) и exon7_Rv: 5'-

СТТГААТТСТТGGTGACATATCAG-3 '(SEQ ID NO: 41)).

Результаты

AON8 был способен блокировать альтернативный участок сплайсинга в интроне 6 и перенацеливать участок сплайсинга обратно на исходный донорный участок, что, который, хотя и ослаблялся вследствие мутации с.768G>T, все еще мог использоваться (фиг.3А и В). В результате мог восстанавливаться сплайсинг пре-мРНК ABCA4.

Пример 2

Далее описано расширение примера 1 с использованием большего количества AON (отличающихся последовательностью, а также химией) и с использованием нескольких клеточных систем (клетки HEK293T и происходящие от пациента фибробласты).

Материалы и способы

Конструирование AON

Для конструирования AON была выбрана небольшая область ABCA4 размером 235 п.н.; ABCA4 с.669 - с.768+135. Затем было сконструировано всего 26 AON (каждый из которых длиной 21 нуклеотид), и они были обозначены как AON10-AON35. AON10-AON34 были сконструированы с химической модификацией 2'-О-метил (2'-ОМе) и AON35 был сконструирован с химией 2'-О-метоксиэтил (2'-О-МОЕ). После первых результатов было заказано пять дополнительных AON с химией 2'-О-МОЕ, они были обозначены как AON36-AON40 и соответствовали последовательностям AON14, -15, -16, -19 и 23, соответственно. Для каждой химии был заказан смысловой олигонуклеотид, содержащий последовательности, комплементарные AON22 и -35, соответственно. Все AON (и SON) приведены в таблице 3. Все приведенные AON имеют фосфоротиоатный остов.

Таблица 3: AON

AON#	SEQ ID NO:	последовательность AON (5'->3')	Химическая модификация
AON10	47	CGAGCAGCCAAACCCCUCCC U	2'-Ome
AON11	48	GGCGAGCAGCCAAACCCUC C	2'-Ome
AON12	49	UUGGCGAGCAGCCAAACCC U	2'-Ome
AON13	50	AAUUGGCGAGCAGCCAAACC C	2'-Ome
AON14	51	GCAAUUGGCGAGCAGCCAAA C	2'-Ome
AON15	52	UUGCAAUUGGCGAGCAGCCA A	2'-Ome

AON16	53	CCUUGCAAUUGGCGAGCAGC C	2'-Ome
AON17	54	CACCUUGCAAUUGGCGAGCA G	2'-Ome
AON18	55	UCACCUUGCAAUUGGCGAGC A	2'-Ome
AON19	56	AUCACCUUGCAAUUGGCGAG C	2'-Ome
AON20	57	AAUCACCUUGCAAUUGGCGA G	2'-Ome
AON21	58	GAAUCACCUUGCAAUUGGCG A	2'-Ome
AON22	59	GGAAUCACCUUGCAAUUGGC G	2'-Ome
AON23	60	AGGAAUCACCUUGCAAUUGG C	2'-Ome
AON24	61	CAGGAAUCACCUUGCAAUUG G	2'-Ome
AON25	62	CCAGGAAUCACCUUGCAAUU G	2'-Ome
AON26	63	CCCAGGAAUCACCUUGCAAU U	2'-Ome
AON27	64	CCCCAGGAAUCACCUUGCAA U	2'-Ome
AON28	65	ACCCCAGGAAUCACCUUGCA A	2'-Ome
AON29	66	UACCCCAGGAAUCACCUUGC A	2'-Ome
AON30	67	CUACCCCAGGAAUCACCUUG C	2'-Ome
AON31	68	GCUACCCCAGGAAUCACCUU G	2'-Ome
AON32	69	UGCUACCCCAGGAAUCACCU U	2'-Ome

AON33	70	CUGCUACCCCAGGAAUCACC U	2'-Ome
AON34	71	UCUGCUACCCCAGGAAUCAC C	2'-Ome
AON35	72	GGAAUCACCUUGCAAUUGGC G	2'-O-метоксиэтил (2'-O-MOE)
AON36	73	GCAAUUGGCGAGCAGCCAAA C	2'-O-MOE
AON37	74	UUGCAAUUGGCGAGCAGCCA A	2'-O-MOE
AON38	75	CCUUGCAAUUGGCGAGCAGC C	2'-O-MOE
AON39	76	AUCACCUUGCAAUUGGCGAG C	2'-O-MOE
AON40	77	AGGAAUCACCUUGCAAUUGG C	2'-O-MOE
2'-OMe SON	78	CGCCAAUUGCAAGGUGAUUC C	2'-Ome
2'-MOE SON	79	CGCCAAUUGCAAGGUGAUUC C	2'-O-MOE

Вхождение AON в клетки HEK293T

Трансфекция клеток HEK293T

Все тесты проводили в двух экземплярах. Клетки HEK293T высевали в 6-ячеечный планшет и трансфицировали 6 мкг мидигена, содержавшего экзон 6 и интрон 6 ABCA4 дикого типа (BA4_WT) и тем же мидигеном, но имеющим мутацию с.768G>T (BA4_MUT). После инкубации в течение ночи клетки HEK293T расщепляли трипсином высевали в 12-луночные планшеты. После прикрепления клеток их трансфицировали AON или SON в концентрации 1 мкМ с использованием FuGENE (каталожный номер № E2311; Promega) и инкубировали в течение 48 ч. Трансфицированные клетки анализировали на уровне РНК посредством ОТ-ПЦР.

Анализ с использованием ОТ-ПЦР

Тотальную РНК выделяли с использованием набора NucleoSpin RNA Clean-up Kit (каталожный номер № 740955250; Macherey-Nagel, Дюрен, Германия) в соответствии с протоколом изготовителя. РНК количественно определяли и кДНК синтезировали с 1 мкг РНК с использованием набора для синтеза кДНК SuperScript VILO (каталожный номер № 11755050; Invitrogen) в соответствии с инструкциями изготовителя, а затем разбавляли H₂O до рабочей концентрации 20 нг/мкл. Эффективность AON оценивали посредством

проведения ПЦР с обратной транскриптазой с использованием следующих праймеров, специфичных к мидигену ВА4: ABCA4 ex6_Fw: 5'-CTTCAGCCAGAGACGCGGGGC-3' (SEQ ID NO: 81) и pCI-Neo-Rho ex5_Rev: 5'-AGGTGTAGGGGATGGGAGAC-3' (SEQ ID NO: 82). ОТ-ПЦР с использованием праймеров, нацеленных на экзон 5 RHO, использовали в качестве контроля для контроля эффективности трансфекции мидигена (pCI-Neo-Rho ex5_Fw: 5'-ATCTGCTGCGGCAAGAAC-3' (SEQ ID NO: 83) и pCI-Neo-Rho ex5_Rev: 5'-AGGTGTAGGGGATGGGAGAC-3' (SEQ ID NO: 84)). Анализ с использованием ОТ-ПЦР проводили с 10 мкмоль/л каждого праймера, 2 мкМ dNTP, 2,5 мМ MgCl₂, 1 Е Taq-полимеразы (Roche, Базель, Швейцария), и 40 нг кДНК в общем объеме реакции 25 мкл с использованием следующих условий ПЦР: 3 мин при 94°C, затем 35 курсов в течение 30 с при 94°C, 30 с при 58°C и 2 мин при 72°C, с конечным удлинением в течение 3 мин при 72°C. Продукты ПЦР разделяли на 2,5% агарозном геле и выбранные полосы подтверждали секвенированием по методу Сэнгера. Наблюдаемые неспецифические полосы не подвергали анализу. Для проведения полуколичественного анализа полосы гетеродуплекса, мутанта и дикого типа, использовали программное обеспечение Fiji. Гетеродуплексную полосу помещали на равном расстоянии между правильным и aberrантным транскриптом для графического представления.

Сравнение эффективности АОН в фибробластах

Трансфекция фибробластных клеток

Получали биоптаты кожи от здорового индивидуума и от пациента с STGD1, гомозиготного по ABCA4 c.768G>T, и получали клеточную линию фибробластов. Фибробластные клетки высевали в 6-ячеечные планшеты и трансфицировали АОН в концентрации 1 мкМ с использованием FuGENE (каталожный номер № E2311; Promega) в присутствии циклогексимида. Трансфицированные клетки анализировали на уровне РНК посредством ОТ-ПЦР.

Анализ с использованием ОТ-ПЦР

Тотальную РНК выделяли с использованием набора NucleoSpin RNA Clean-up Kit (каталожный номер № 740955250; Macherey-Nagel, Дюрен, Германия) в соответствии с протоколом изготовителя. РНК количественно определяли и кДНК синтезировали с 1 мкг РНК с использованием набора для синтеза кДНК SuperScript VILO (каталожный номер № 11755050; Invitrogen) в соответствии с инструкциями изготовителя, а затем разбавляли H₂O до рабочей концентрации 20 нг/мкл. Эффективность АОН оценивали посредством проведения ПЦР с обратной транскриптазой с использованием следующих праймеров для ABCA4: exon5_Fw: 5' GGAATACGAATAAGGGATATCTTG-3' (SEQ ID NO: 85) и exon7_Rev: 5'-CTTGAATTCTTGGTGACATATCAG-3' (SEQ ID NO: 86) и гнездовой ПЦР на фибробластах, имеющих ABCA4 c.768G>T, с использованием следующих праймеров для ABCA4: PCR1 exon4_Fw: 5'-CACCCGGAGAGAATTGCAG-3' (SEQ ID NO: 87) и exon8_Rev: 5'-CCTGCATACTCGGCCGATG-3' (SEQ ID NO: 88) и PCR2 exon5_Fw: 5' GGAATACGAATAAGGGATATCTTG-3' (SEQ ID NO: 89) и exon7_Rev: 5'-CTTGAATTCTTGGTGACATATCAG-3' (SEQ ID NO: 90). ОТ-ПЦР на контрольной

фибробластной клеточной линии проводили с 10 мкМ праймером exon5_Fw и exon7_Rw, 2 мкМ dNTP, 2,5 mM MgCl₂, 1 Е Taq-полимеразы (Roche, Базель, Швейцария), и 80 нг кДНК в общем объеме реакции 25 мкл с использованием следующих условий ПЦР: 3 мин при 94°C, затем 35 курсов в течение 30 с при 94°C, 30 с при 58°C и 2 мин при 72°C, с конечным удлинением в течение 3 мин при 72°C. ОТ-ПЦР фибробластах, имеющих мутацию ABCA4 с.768G>T, проводили с 10 мкМ праймером exon4_Fw и exon8_Rw, 2 мкМ dNTP, 2,5 mM MgCl₂, 1 Е Taq-полимеразы (Roche, Базель, Швейцария), и 80 нг кДНК в общем объеме реакции 25 мкл с использованием следующих условий ПЦР: 3 мин при 94°C, затем 40 курсов в течение 30 с при 94°C, 30 с при 58°C и 2 мин при 72°C, с конечным удлинением в течение 3 мин при 72°C. Гнездовую ПЦР проводили, как описано выше, 0,5 мкл продукта PCR1 использовали в качестве ПЦР-матрицы для гнездовой ПЦР с использованием следующих условий: 3 мин при 94°C, затем 35 курсов в течение 30 с при 94°C, 30 с при 58°C и 2 мин при 72°C, с конечным удлинением в течение 3 мин при 72°C. Все продукты ПЦР разделяли на 2,5% агарозном геле и выбранные полосы подтверждали секвенированием по методу Сэнгера. Наблюдаемые неспецифические полосы не подвергали анализу. Для проведения полуколичественного анализа полосы гетеродуплекса, мутанта и дикого типа, использовали программное обеспечение Fiji. Актин (ACTB) амплифицировали, чтобы он служил в качестве нагрузочного контроля. Праймер: P49750_Fw_ACTB exon 3: 5'-ACTGGGACGACATGGAGAAG-3' (SEQ ID NO: 91), праймер: P49751_Rev_ACTB exon 4: 5'-TCTCAGCTGTGGTGGTGAAG-3' (SEQ ID NO: 92).

Результаты и обсуждение

Восстановление посредством AON в клетках HEK293T

Для идентификации наиболее эффективного AON, который способен восстанавливать дефект сплайсинга, ассоциированный с мутацией с.768G>T (удлинение на 35 нуклеотидов), использовали "oligo-walk" с последовательностями AON, которые нацелены на область вокруг альтернативного участка сплайсинга (в положении с.768+35) и отличаются только одним или двумя нуклеотидами от одного до следующего (фиг.4). Мидигены, содержавшие геномный фрагмент ABCA4, имеющий либо G (WT), либо T (MUT), в положении с.768 трансфицировали в клетки HEK293T, а затем совместно трансфицировали с различными AON или не подвергали совместной трансфекции. В первой серии большинство AON включали ранее использованную химию с фосфоротиоатным остовом и модификацией 2'-О-метилом (2'-OMe), только AON35 отличался и имел 2'-О-метоксиэтил (2'-O-MOE) вместо 2'-Оме с той же последовательностью, что и у AON22. Как можно видеть из фиг.5, все AON были способны к некоторой степени перенацеливания дефектного сплайсинга, который наблюдался при трансфекции мидигена MUT. AON 14, -15, -16, -19, -22 и -23 оказались наиболее эффективными при наличии химии 2'-Оме. Интересно, что AON35 с позднее осуществленной химией 2'-О-МОЕ, был наиболее способными к перенацеливанию сплайсинга в направлении нормальных транскриптов ABCA4, как подтверждено

посредством количественного определения и секвенирования по методу Сэнгера. Все эксперименты проводили в двух повторениях. Результаты введения AON в клетки HEK293T с мидигеном WT не продемонстрировали никаких дефектов сплайсинга (данные не представлены).

Учитывая перспективные результаты для химии 2'-O-MOE, авторы изобретения решили заказать AON с последовательностью AON 14, -15, -16, -19 и 23 (AON35, уже соответствовал AON22) также с химией 2'-O-MOE. Они были обозначены как AON 36-40, и их потенциальную эффективность оценивали в клетках HEK293T аналогичным образом. Как можно видеть на фиг.6, ранее эффективный AON35, а также AON36, -38 и -40 были в высокой степени эффективными в отношении коррекции aberrантных процессов сплайсинга. AON39 был несколько менее эффективным, в то время как AON37 практически не продемонстрировал восстановления.

Восстановление посредством AON в фибробластах

Далее для наиболее эффективных AON в клетках HEK293T, по шесть для каждой химии, авторы изобретения поставили цель оценить их способность к перенацеливанию сплайсинга в происходящих от пациента фибробластных клетках, поскольку эти клетки имеют мутацию c.768G>T в их геномной ДНК и, таким образом, позволяют оценку ассоциированного с ней дефекта сплайсинга при эндогенной экспрессии ABCA4. Фибробластные клетки от индивидуума с STGD1, имеющего мутацию c.768G>T в гомозиготном состоянии, трансфицировали наиболее эффективными AON, имеющими либо химию 2'-Ome, либо химию 2'-O-MOE. Как показано на фиг.7, была определена некоторая коррекция сплайсинга, но тем не менее, эффективность была меньшей по сравнению с результатами, полученными в клетках HEK293T. Из всех AON AON35 и -40, оба из которых имели химию 2'-O-MOE, оказались имеющими наиболее сильный эффект. Причина наличия меньшей эффективности в фибробластах по сравнению с клетками HEK293T, наиболее вероятно, объясняется тем фактом, что в клетках HEK293T экспрессировалась только часть транскрипта ABCA4, в то время как в фибробластах присутствовала вся мРНК. Таким образом, сворачивание молекулы пре-мРНК может полностью отличаться, что также влияет на доступ AON. Кроме того, может различаться эффективность трансфекции на клетку, а также стабильность пре-мРНК ABCA4.

Заключения

Посредством увеличения количества AON, потенциально способных к перенацеливанию aberrантного сплайсинга ABCA4 вследствие мутации c.768G>T, был сделан ряд интересных открытий. Сначала, посредством использования системы мидигена ABCA4 в комбинации с "oligo-walk" авторы изобретения обнаружили, что практически все AON были в некоторой степени способными перенацеливать сплайсинг, но, тем не менее, наблюдались значимые отличия между AON. AON14, -15, -16, -19, -22 и -23, все с химией 2'-Ome, были наиболее эффективными. Интересно, что AON35, который имел химию 2'-O-MOE, превосходил все AON с химией 2'-Ome. Сходные наблюдения были сделаны для ряда дополнительных AON (AON36-AON40), все с химией 2'-O-MOE, тем не менее,

также с различной эффективностью между последовательностями AON. В фибробластных клетках AON не были настолько же эффективными, как в клетках HEK293T, что указывает на то, что либо поглощение AON этими клетками является менее эффективным, и/либо доступность транскрипта-мишени для AON является меньшей, вследствие, например, сворачивания пре-мРНК ABCA4 в эндогенном контексте, что не происходит в системе HEK293T с мидигеном.

В совокупности, авторы изобретения идентифицировали наиболее эффективные последовательности AON для нацеливания на дефект сплайсинга, вызываемый с.768G>T, авторы изобретения продемонстрировали, что AON с химией 2'-О-МОЕ оказались более эффективными, чем AON с химией 2'-ОМе.

ССЫЛКИ

Albert S, Garanto A, Sangermano R, Khan M, Bax NM, Hoynг CB, Zernant J, Lee W, Allikmets R, Collin RWJ, Cremers FPM (2018). Identification and Rescue of Splice Defects Caused by Two Neighboring Deep-Intronic ABCA4 Mutations Underlying Stargardt Disease. *Am J Hum Genet*, 102: 517-527.

Allikmets, R., Singh, N., Sun, H., Shroyer, N. F., Hutchinson, A., Chidambaram, A., Gerrard, B., Baird, L., Stauffer, D., Peiffer, A., Rattner, A., Smallwood, P., Li, Y., Anderson, K. L., Lewis, R. A., Nathans, J., Leppert, M., Dean, M. & Lupski, J. R. A photoreceptor cell-specific ATP-binding transporter gene (ABCR) is mutated in recessive Stargardt macular dystrophy. *Nat. Genet.* 15, 236-246 (1997), doi:10.1038/ng0397-236.

Bauwens, M., De Zaeytijd, J., Weisschuh, N., Kohl, S., Meire, F., Dahan, K., Depasse, F., De Jaegere, S., De Ravel, T., De Rademaeker, M., Loeys, B., Coppieters, F., Leroy, B. P. & De Baere, E. An augmented ABCA4 screen targeting noncoding regions reveals a deep intronic founder variant in Belgian Stargardt patients. *Hum. Mutat.* 36, 39-42 (2015), doi:10.1002/humu.22716.

Bax, N. M., Sangermano, R., Roosing, S., Thiadens, A. A., Hoefsloot, L. H., van den Born, L. I., Phan, M., Klevering, B. J., Westeneng-van Haaften, C., Braun, T. A., Zonneveld-Vrieling, M. N., de Wijs, I., Mutlu, M., Stone, E. M., den Hollander, A. I., Klaver, C. C., Hoynг, C. B. & Cremers, F. P. M. Heterozygous deep-intronic variants and deletions in ABCA4 in persons with retinal dystrophies and one exonic ABCA4 variant. *Hum. Mutat.* 36, 43-47 (2015), doi:10.1002/humu.22717.

Braun, T. A., Mullins, R. F., Wagner, A. H., Andorf, J. L., Johnston, R. M., Bakall, B. B., Deluca, A. P., Fishman, G. A., Lam, B. L., Weleber, R. G., Cideciyan, A. V., Jacobson, S. G., Sheffield, V. C., Tucker, B. A. & Stone, E. M. Non-exonic and synonymous variants in ABCA4 are an important cause of Stargardt disease. *Hum. Mol. Genet.* 22, 5136-5145 (2013), doi:10.1093/hmg/ddt367.

Collin RWJ, den Hollander AI, van der Velde-Visser S, Bennicelli J, Bennett J, Cremers FPM (2012). Antisense oligonucleotide (AON)-based therapy for Leber Congenital Amaurosis caused by a frequent mutation in CEP290. *Mol Ther Nucl Acids*, e14.

Cremers, F. P. M., van de Pol, D. J., van Driel, M., den Hollander, A. I., van Haren, F. J.,

Knoers, N. V., Tijmes, N., Bergen, A. A., Rohrschneider, K., Blankenagel, A., Pinckers, A. J., Deutman, A. F. & Hoyng, C. B. Autosomal recessive retinitis pigmentosa and cone-rod dystrophy caused by splice site mutations in the Stargardt's disease gene ABCR. *Hum. Mol. Gen.* 7, 355-362 (1998).

Fujinami, K., Zernant, J., Chana, R. K., Wright, G. A., Tsunoda, K., Ozawa, Y., Tsubota, K., Webster, A. R., Moore, A. T., Allikmets, R. & Michaelides, M. ABCA4 gene screening by next-generation sequencing in a British cohort. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 54, 6662-6674 (2013), doi:10.1167/iovs.13-12570.

Garanto A, Chung DC, Duijkers L, Corral-Serrano JC, Messchaert M, Xiao R, Bennett J, Vandenberghe LH, Collin RWJ (2016). In vitro and in vivo rescue of aberrant splicing in CEP290-associated LCA by antisense oligonucleotide delivery. *Hum Mol Genet*, 25: 2552-2563.

Garanto A & Collin RWJ (2018). Design and in vitro use of antisense oligonucleotides to correct pre-mRNA splicing defects in inherited retinal dystrophies. *Methods Mol Biol*, 1715: 61-78.

Garanto, A., et al., In vitro and in vivo rescue of aberrant splicing in CEP290-associated LCA by antisense oligonucleotide delivery. *Hum Mol Genet*, 2016. 25(12): p. 2552-2563.

Lewis, R. A., Shroyer, N. F., Singh, N., Allikmets, R., Hutchinson, A., Li, Y., Lupski, J. R., Leppert, M. & Dean, M. Genotype/Phenotype analysis of a photoreceptor-specific ATP-binding cassette transporter gene, ABCR, in Stargardt disease. *Am. J. Hum. Genet.* 64, 422-434 (1999), doi:10.1086/302251.

Maugeri, A., van Driel, M. A., van de Pol, D. J., Klevering, B. J., van Haren, F. J., Tijmes, N., Bergen, A. A., Rohrschneider, K., Blankenagel, A., Pinckers, A. J., Dahl, N., Brunner, H. G., Deutman, A. F., Hoyng, C. B. & Cremers, F. P. M. The 2588G-->C mutation in the ABCR gene is a mild frequent founder mutation in the Western European population and allows the classification of ABCR mutations in patients with Stargardt disease. *Am. J. Hum. Genet.* 64, 1024-1035 (1999).

Maugeri, A., Klevering, B. J., Rohrschneider, K., Blankenagel, A., Brunner, H. G., Deutman, A. F., Hoyng, C. B. & Cremers, F. P. M. Mutations in the ABCA4 (ABCR) gene are the major cause of autosomal recessive cone-rod dystrophy. *Am. J. Hum. Genet.* 67, 960-966 (2000), doi:10.1086/303079.

Martinez-Mir, A., Paloma, E., Allikmets, R., Ayuso, C., del Rio, T., Dean, M., Vilageliu, L., Gonzalez-Duarte, R. & Balcells, S. Retinitis pigmentosa caused by a homozygous mutation in the Stargardt disease gene ABCR. *Nat. Genet.* 18, 11-12 (1998), doi:10.1038/ng0198-11.

Rivera, A., White, K., Stohr, H., Steiner, K., Hemmrich, N., Grimm, T., Jurklies, B., Lorenz, B., Scholl, H. P., Apfelstedt-Sylla, E. & Weber, B. H. A comprehensive survey of sequence variation in the ABCA4 (ABCR) gene in Stargardt disease and age-related macular degeneration. *Am. J. Hum. Genet.* 67, 800-813 (2000), doi:10.1086/303090.

Sangermano R, Bax NM, Bauwens M, van den Born LI, de Baere E, Garanto A, Collin RWJ, Goercharn-Ramlal AS, den Engelsman-van Dijk AH, Rohrschneide K, Hoyng CB, Cremers FPM, Albert S (2016). Photoreceptor progenitor mRNA analysis reveals exon skipping

resulting from the ABCA4 c.5461-10T>C mutation in Stargardt disease. *Ophthalmology*, 123: 1375-1385.

Sangermano R, Khan M, Cornelis SS, Richelle V, Albert S, Garanto A, Elmelik D, Qamar R, Lugtenberg D, van den Born LI, Collin RWJ, Cremers FPM (2018). ABCA4 midigenes reveal the full splice spectrum of all reported noncanonical splice site variants in Stargardt disease. *Genome Res*, 28: 100-110.

Schulz, H. L., Grassmann, F., Kellner, U., Spital, G., Ruther, K., Jagle, H., Hufendiek, K., Rating, P., Huchzermeyer, C., Baier, M. J., Weber, B. H. & Stohr, H. Mutation spectrum of the ABCA4 gene in 335 Stargardt disease patients from a multicenter German cohort-impact of selected deep intronic variants and common SNPs. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 58, 394-403 (2017), doi:10.1167/iovs.16-19936.

van Driel, M. A., Maugeri, A., Klevering, B. J., Hoyng, C. B. & Cremers, F. P. M. ABCR unites what ophthalmologists divide(s). *Ophthalmic Genet.* 19, 117-122 (1998).

Webster, A. R., Heon, E., Lotery, A. J., Vandenberg, K., Casavant, T. L., Oh, K. T., Beck, G., Fishman, G. A., Lam, B. L., Levin, A., Heckenlively, J. R., Jacobson, S. G., Weleber, R. G., Sheffield, V. C. & Stone, E. M. An analysis of allelic variation in the ABCA4 gene. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 42, 1179-1189 (2001).

Zernant, J., Lee, W., Collison, F. T., Fishman, G. A., Sergeev, Y. V., Schuerch, K., Sparrow, J. R., Tsang, S. H. & Allikmets, R. Frequent hypomorphic alleles account for a significant fraction of ABCA4 disease and distinguish it from age-related macular degeneration. *J. Med. Genet.* 54, 404-412 (2017), doi:10.1136/jmedgenet-2017-104540.

Zernant, J., Schubert, C., Im, K. M., Burke, T., Brown, C. M., Fishman, G. A., Tsang, S. H., Gouras, P., Dean, M. & Allikmets, R. Analysis of the ABCA4 gene by next-generation sequencing. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 52, 8479-8487 (2011), doi:10.1167/iovs.11-8182.

Zhou, S., et al., Differentiation of human embryonic stem cells into cone photoreceptors through simultaneous inhibition of BMP, TGFbeta and Wnt signaling. *Development*, 2015. 142(19): p. 3294-306.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Антисмысловой олигонуклеотид для перенацеливания сплайсинга, который связывает и/или комплементарен полинуклеотиду с нуклеотидной последовательностью, как показано в SEQ ID NO: 4, предпочтительно антисмысловой олигонуклеотид связывает или комплементарен полинуклеотиду SEQ ID NO: 5, более предпочтительно антисмысловой олигонуклеотид связывает или комплементарен полинуклеотиду SEQ ID NO: 80, еще более предпочтительно антисмысловой олигонуклеотид связывает или комплементарен полинуклеотиду, выбранному из группы, состоящей из SEQ ID NO: 7, 8, 9; 11, 12,13; 15, 16, 17; 19, 20, и 21.

2. Антисмысловой олигонуклеотид для перенацеливания сплайсинга по п.1, где нуклеотид в антисмысловом олигонуклеотиде может представлять собой остаток РНК, остаток ДНК, или нуклеотидный аналог или эквивалент.

3. Антисмысловой олигонуклеотид для перенацеливания сплайсинга по п.1, где антисмысловой олигонуклеотид имеет длину от приблизительно 8 до приблизительно 40 нуклеотидов, предпочтительно от приблизительно 10 до приблизительно 40 нуклеотидов, более предпочтительно от приблизительно 14 до приблизительно 30 нуклеотидов, более предпочтительно от приблизительно 16 до приблизительно 24 нуклеотидов, как например, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 или 24 нуклеотидов.

4. Антисмысловой олигонуклеотид для перенацеливания сплайсинга по любому из предшествующих пунктов, где антисмысловой олигонуклеотид содержит или состоит из SEQ ID NO: 34, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 73, 75 или 77.

5. Антисмысловой олигонуклеотид для перенацеливания сплайсинга по любому из пп.1-3, содержащий 2'-О алкил-фосфоротиоатный антисмысловой олигонуклеотид, такой как 2'-О-метил-модифицированная рибоза (РНК), 2'-О-этил-модифицированная рибоза, 2'-О-метоксиэтил-модифицированная рибоза, 2'-О-пропил-модифицированная рибоза и/или замещенные производные этих модификаций, такие как галогенированные производные.

6. Антисмысловой олигонуклеотид для перенацеливания сплайсинга по любому из предшествующих пунктов, где антисмысловой олигонуклеотид содержит или состоит из SEQ ID NO: 34, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 73, 75 или 77, и где антисмысловой олигонуклеотид содержит 2'-О-метил-модифицированную рибозу (РНК) или 2'-О-метоксиэтил-модифицированную рибозу и фосфоротиоатный остов.

7. Вирусный вектор, экспрессирующий антисмысловой олигонуклеотид для перенацеливания сплайсинга по любому из пп.1-4, когда он помещен в условия, способствующие экспрессии молекулы.

8. Фармацевтическая композиция, содержащая антисмысловой олигонуклеотид для перенацеливания сплайсинга по любому из пп.1-4 или вирусный вектор по п.7 и фармацевтически приемлемый эксципиент.

9. Фармацевтическая композиция по п.8, где фармацевтическая композиция предназначена для интравитреального введения, и ее дозируют в количестве в диапазоне от 0,05 мг до 5 мг антисмысловых олигонуклеотидов в целом.

10. Фармацевтическая композиция по пп.8 и 9, где фармацевтическая композиция предназначена для интравитреального введения, и ее дозируют в количестве в диапазоне от 0,1 до 1 мг антисмысловых олигонуклеотидов для перенацеливания сплайсинга на глаз в целом, как например, приблизительно 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9 или 1,0 мг антисмысловых олигонуклеотидов для перенацеливания сплайсинга на глаз в целом.

11. Антисмысловой олигонуклеотид для перенацеливания сплайсинга по любому из пп.1-4, вектор по п.7 или фармацевтическая композиция по любому из пп.8-10 для применения в качестве лекарственного средства, предпочтительно для применения для лечения связанного с ABCA4 заболевания или состояния, требующего модулирования сплайсинга ABCA4.

12. Применение антисмыслового олигонуклеотида для перенацеливания сплайсинга по пп.1-4, вектора по п.7 или фармацевтической композиции по любому из пп.8-10 для лечения связанного с ABCA4 заболевания или состояния, требующего модулирования сплайсинга ABCA4.

13. Способ модулирования сплайсинга ABCA4 в клетке, причем указанный способ включает приведение указанной клетки в контакт с антисмысловым олигонуклеотидом для перенацеливания сплайсинга по любому из пп.1-4, вектора по п.7 или фармацевтической композиции по любому из пп.8-10.

14. Антисмысловой олигонуклеотид для перенацеливания сплайсинга для применения по п.11, применение по п.12 или способ по п.13, где связанное с ABCA4 заболевание или состояние представляет собой болезнь Штаргардта.

ФИГ.1А

SEQ ID NO: 42

Мутация ABCA4c.768G>T

Дикий тип AGCTCTCCGTGTGGTAAGGGAGGGGTTTGGCTGCTCGCCAATTGCAAGGTGATTCCTG

SpliceSiteFinder-like: 83.4 83.0

HumanSplicingFinder: 91.6 85.6

SEQ ID NO: 43

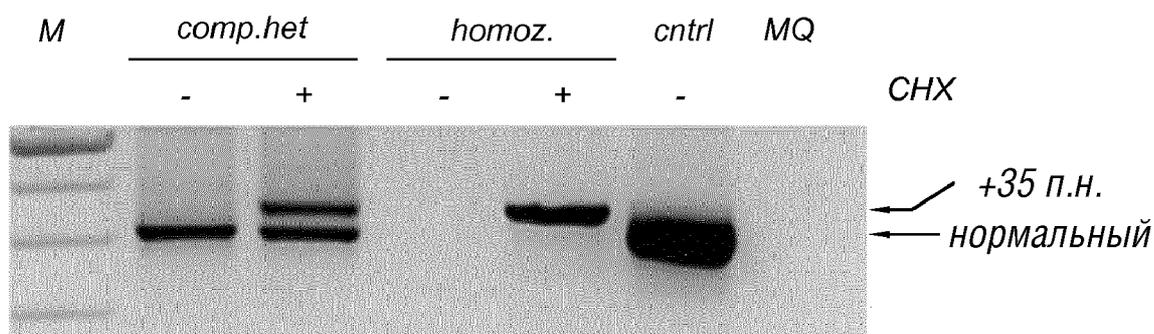
Мутант AGCTCTCCGTGTGGTAAGGGAGGGGTTTGGCTGCTCGCCAATTGCAAGGTGATTCCTG

SpliceSiteFinder-like: 70.8 83.0

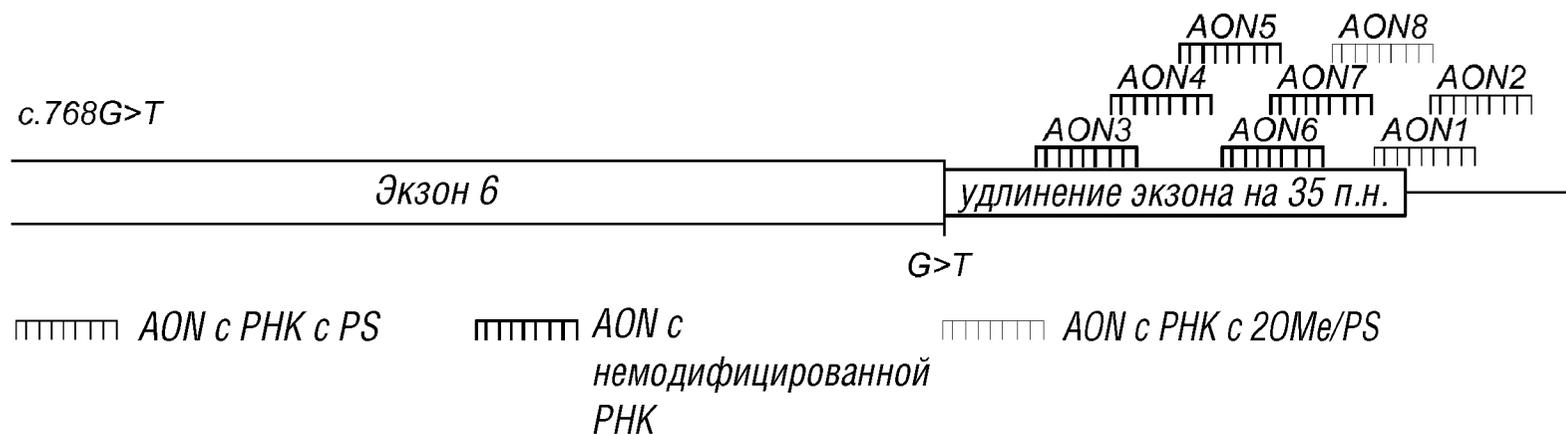
HumanSplicingFinder: 80.7 85.6

ФИГ.1В

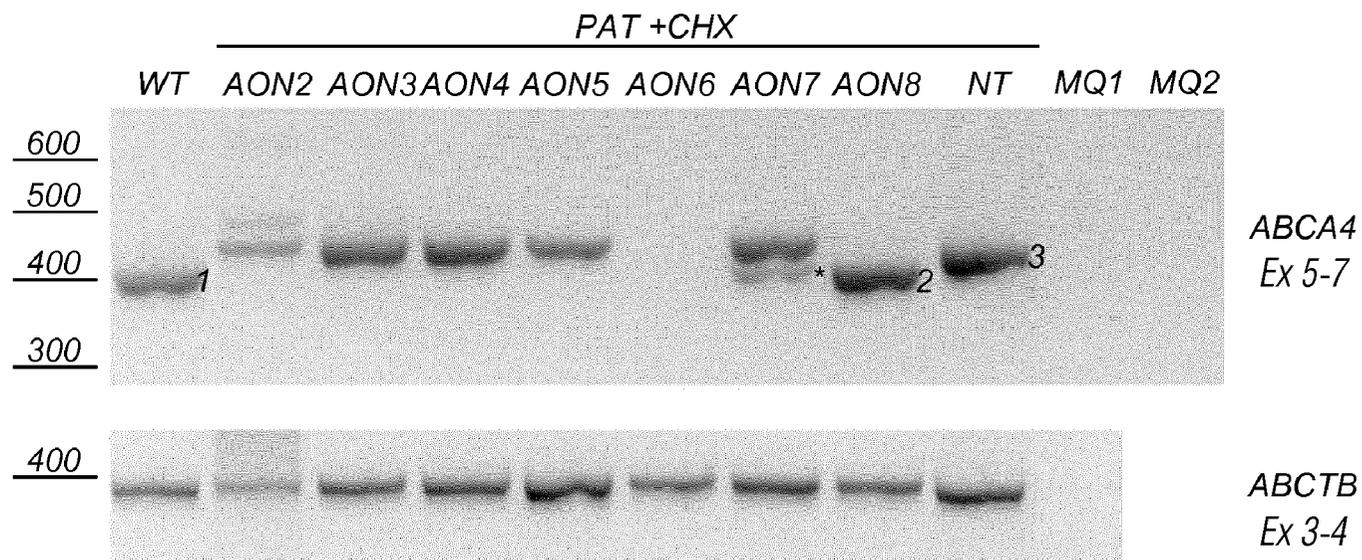
Анализ с использованием ОТ-ПЦР



ФИГ.2

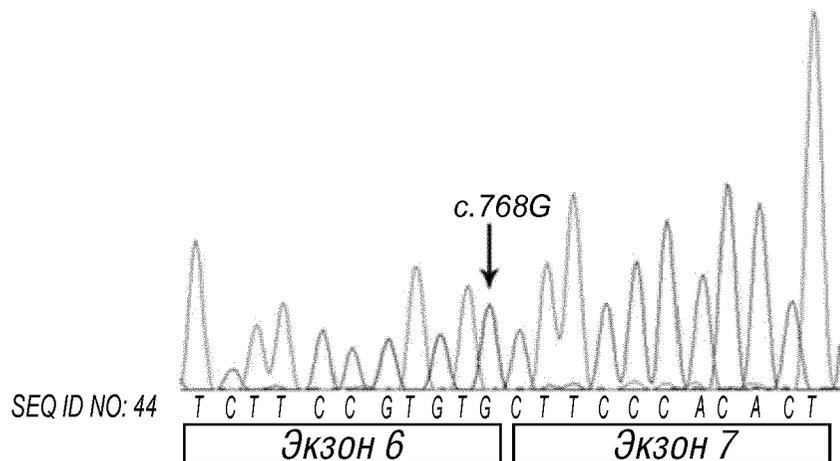


ФИГ.3А

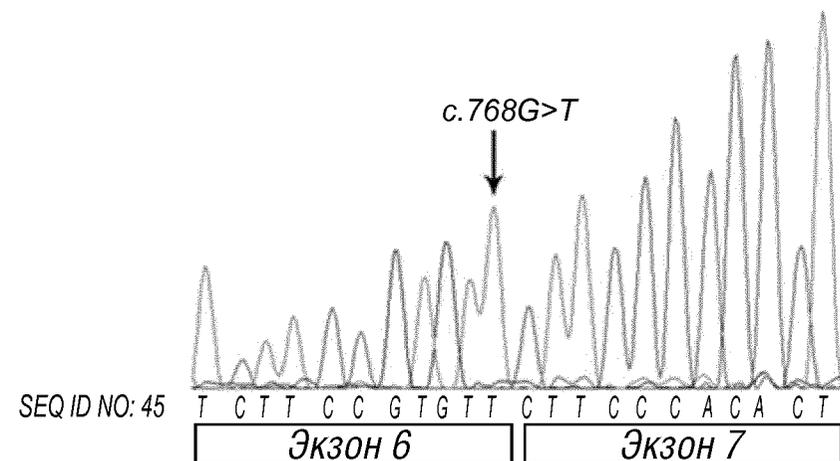


ФИГ.3В

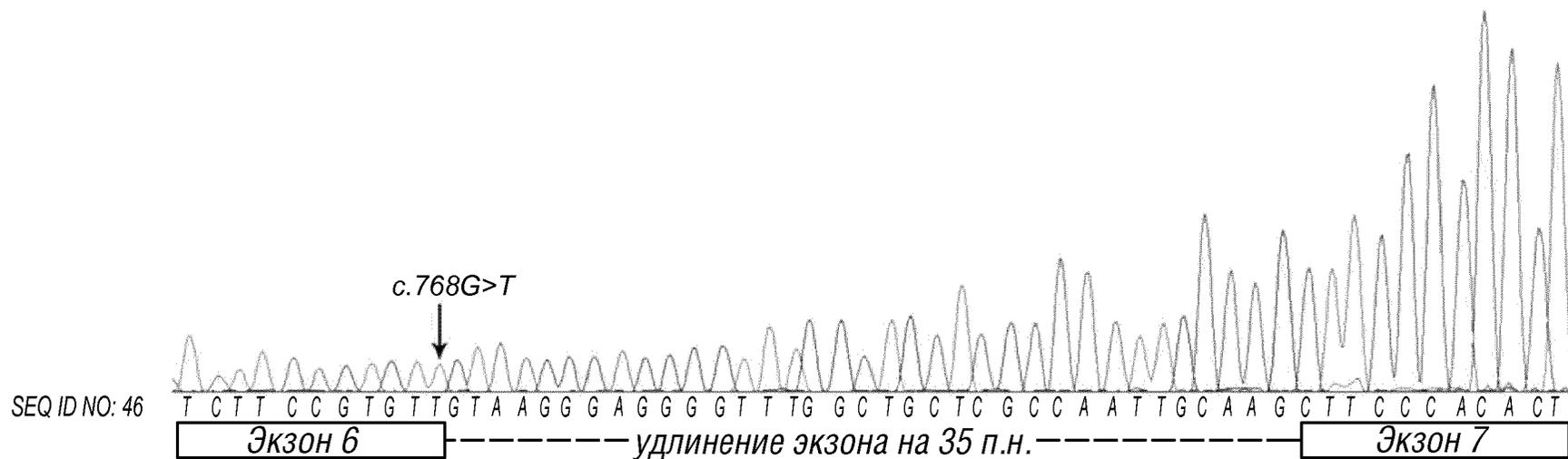
Полоса 1



Полоса 2



Полоса 3

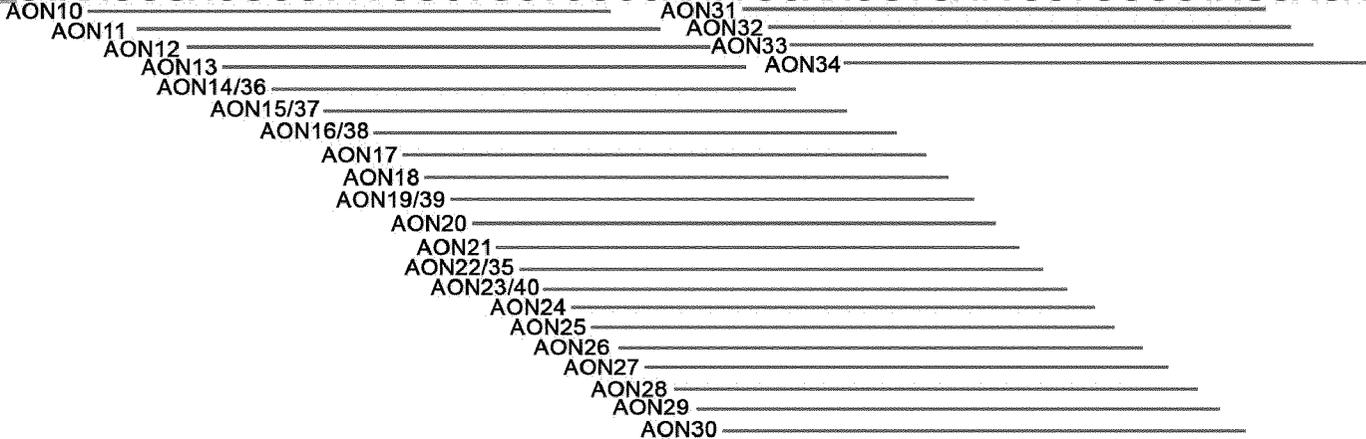


ФИГ.4

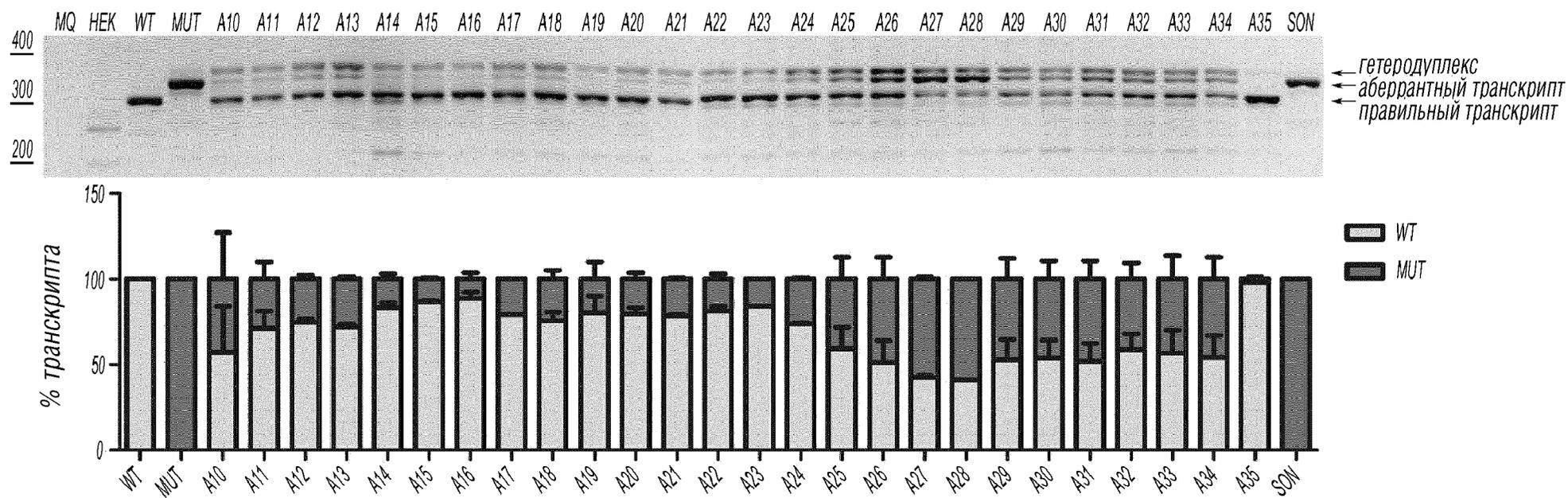
SEQ ID NO: 80

Мутация с.768G>T

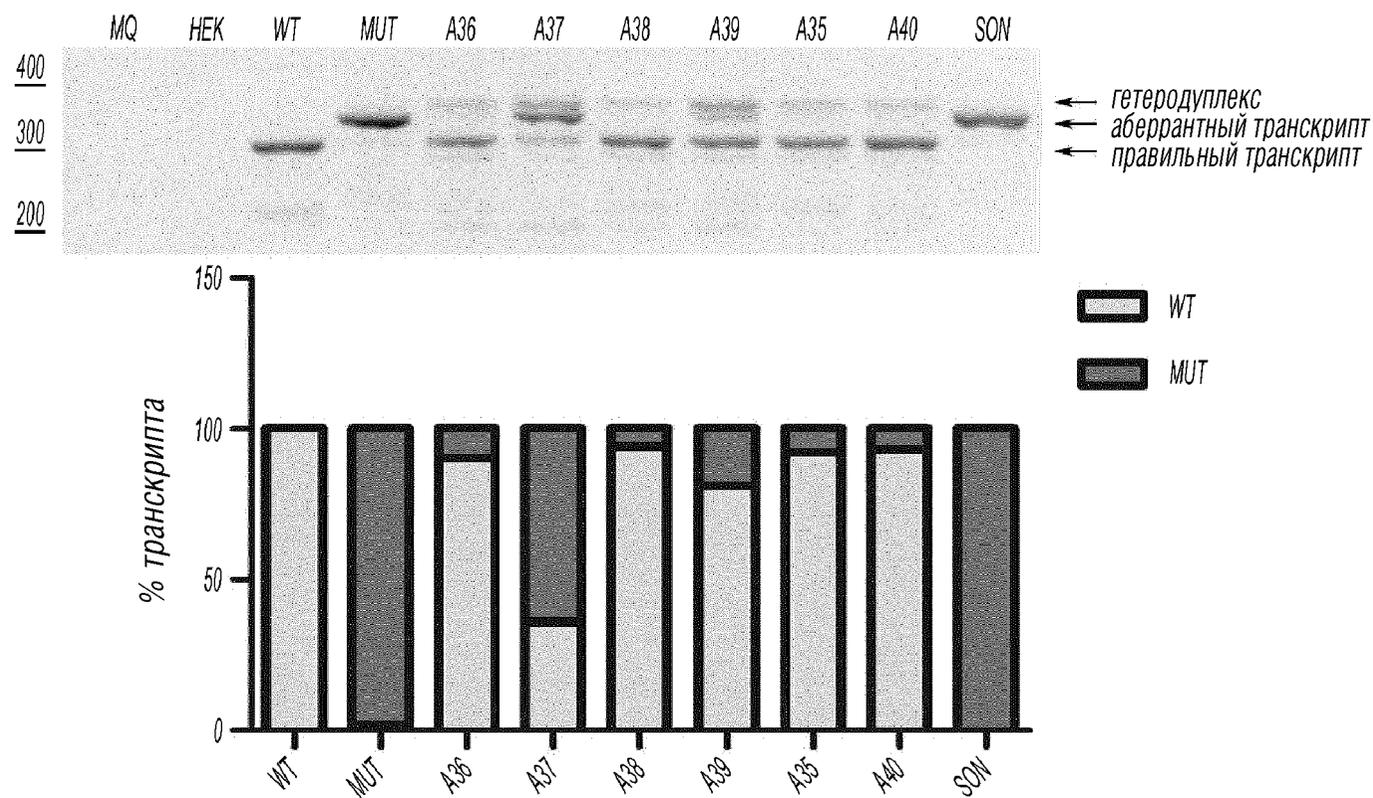
СТТССГТГТТГТААГГГАГГГГТТТГГСТГСТСГССААТТГСААГГТГАТТСТТГГГГТАГСАГАГСТТСТСГСАА



ФИГ.5



ФИГ.6



ФИГ.7

