

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **202390939** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки  
**2024.05.17**

(22) Дата подачи заявки  
**2017.12.13**

(51) Int. Cl. *C12N 15/113* (2010.01)  
*A61K 31/712* (2006.01)  
*A61K 31/7125* (2006.01)  
*A61P 27/02* (2006.01)

---

(54) **АНТИСМЫСЛОВЫЕ ОЛИГОНУКЛЕОТИДЫ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ БОЛЕЗНИ  
ШТАРГАРДТА**

---

(31) **16203864.0; 17189492.6**

(32) **2016.12.13; 2017.09.05**

(33) **EP**

(62) **201991460; 2017.12.13**

(71) Заявитель:

**СТИХТИНГ РАДБАУД  
УНИВЕРСИТАЙР МЕДИС  
СЕНТРИУМ (NL)**

(72) Изобретатель:

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

(74) Представитель:

**Медведев В.Н. (RU)**

---

(57) Настоящее изобретение относится к области медицины. В частности, оно относится к новым антисмысловым олигонуклеотидам, которые можно использовать для лечения, профилактики и/или замедления болезни Штаргардта.

**A1**

**202390939**

**202390939**

**A1**

**АНТИСМЫСЛОВЫЕ ОЛИГОНУКЛЕОТИДЫ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ БОЛЕЗНИ ШТАРГАРДТА****Область изобретения**

Настоящее изобретение относится к области медицины. В частности, оно относится к новым антисмысловым олигонуклеотидам, которые можно использовать для лечения, профилактики и/или замедления болезни Штаргардта.

**Предшествующий изобретению уровень техники**

Аутосомно-рецессивные мутации в *ABCA4* вызывают болезнь Штаргардта, прогрессирующее нарушение, которое характеризуется потерей центрального зрения и часто приводит к полной слепоте. Типичным признаком болезни Штаргардта является наличие множества желтых пятен (крапинок), распределенных на всем протяжении сетчатки пациентов. Ген *ABCA4* состоит из 50 экзонов и кодирует белок, состоящий из 2273 аминокислот. Этот белок экспрессируется во внешних сегментах колбообразных и палочкообразных рецепторных клеток и играет важную роль в удалении побочных продуктов после фотопреобразования.

Помимо STGD1, варианты *ABCA4* могут также приводить к другим подтипам заболевания сетчатки в диапазоне от макулопатии в виде бычьего глаза до аутосомно-рецессивной колбочково-палочковой дистрофии (arCRD; Cremers et al, 1998; Maugeri et al, 2000) и панретинальных дистрофий (Cremers et al, 1998; Martinez-Mir et al, 1998; Shroyer et al, 2001; Duncker et al, 2014), в зависимости от тяжести аллелей.

Двухаллельные варианты *ABCA4* можно выявить приблизительно в 80% случаев 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 arCRD (Maugeri et al, 2000), после секвенирования кодирующих областей и прилегающих сайтов сплайсинга. В основном, индивидуумы с arCRD или панретинальной дистрофией имеют два тяжелых аллеля *ABCA4*, в то время как индивидуумы с STGD1 имеют два умеренно тяжелых варианта или сочетание легкого и тяжелого вариантов (Maugeri et al, 1999; van

Driel et al, 1998). Было выдвинуто предположение, что большинство утраченных вариантов *ABCA4* у пациентов с STGD1 расположены в интронных областях гена, и фактически, за последние несколько лет, несколько групп показали присутствие таких вариантов в глубине интрона (Bauwens et al, 2015; Vax et al, 2015; Braun et al, 2013; Lee et al, 2016; Schulz et al, 2017; Zernant et al, 2014). В 2013, Браун с коллегами (Braun et al, 2013) описали два варианта в интроне 30 (с.4539+2001G>A и с.4539+2028C>T, далее обозначенные M1 и M2, соответственно), которые предположительно могли влиять на сплайсинг пре-мРНК *ABCA4*, пока без предоставления экспериментальных данных. До настоящего времени M2 был выявлен в 13 случаях (Bauwens et al, 2015; Vax et al, 2015; Braun et al, 2013; Lee et al, 2016; Schulz et al, 2017; Zernant et al, 2014). M1 был обнаружен в 31 случае и, что интересно, особенно часто встречался в голландской и бельгийской популяциях (Bauwens et al, 2015; Vax et al, 2015; Braun et al, 2013; Lee et al, 2016; Zernant et al, 2014). Кроме того, мы идентифицировали несколько дополнительных мутаций *ABCA4* в глубине интрона, которые приводят к вставке псевдоэкзонов, либо за счет активации криптического акцепторного или донорного сайтов сплайсинга, или за счет усиления мотивов ESE, которые расположены внутри псевдоэкзонов. Эти дополнительные мутации включают с.769-784C>T, с.859-540C>G, с.859-506G>C, с.1937+435C>G, с.4539+1100A>G, с.4539+1106C>T, с.5197-557G>T.

В настоящее время, проводятся несколько клинических испытаний для STGD1, использующих различные терапевтические стратегии (<http://www.clinicaltrials.gov>): i) генозаместительную терапию за счет доставки полной кДНК *ABCA4* (~6,8 т.п.н.) при помощи лентивирусного вектора (NCT01367444 и NCT01736592); ii) субретинальную трансплантацию клеток пигментного эпителия сетчатки, полученных из эмбриональных стволовых клеток человека (hESC-РПЭ) (NCT02445612 и NCT02941991) и iii) введение C20-D3-ретилацетата (NCT02402660). Каждый из этих подходов имеет ограничения, и до сих пор не было получено данных об эффективности этих клинических испытаний.

Поскольку значительное количество мутаций в АВСА4 влияет на сплайсинг пре-мРНК АВСА4, они представляют собой привлекательную мишень для регуляции сплайсинга путем терапии на основе антисмысловых олигонуклеотидов (АОН). Таким образом, существует необходимость в разработке АОН для регуляции сплайсинга гена АВСА4, чтобы обеспечить экспрессию функционального белка АВСА4 у индивидуумов, страдающих от болезни Штаргардта.

#### **Сущность изобретения**

Изобретение относится к антисмысловому олигонуклеотиду для перенаправления сплайсинга, который:

- комплементарен или по существу комплементарен полинуклеотиду с нуклеотидной последовательностью, состоящей из SEQ ID NO: 10, 161, 30, 81, 101, 121, 141 или SEQ ID NO: 261, или их части;

- предпочтительно комплементарен или по существу комплементарен полинуклеотиду с нуклеотидной последовательностью, состоящей из SEQ ID NO: 162, 181, 82, 102, 122, 142 или SEQ ID NO: 262, или их части;

- более предпочтительно комплементарен или по существу комплементарен полинуклеотиду с нуклеотидной последовательностью, состоящей из SEQ ID NO: 160, 180, 80, 100, 120, 140 или SEQ ID NO: 260, или их части

- более предпочтительно комплементарен или по существу комплементарен полинуклеотиду с нуклеотидной последовательностью, состоящей из SEQ ID NO: 11 или SEQ ID NO: 31, или их части;

- более предпочтительно комплементарен или по существу комплементарен полинуклеотиду с нуклеотидной последовательностью, состоящей из SEQ ID NO: 12 или SEQ ID NO: 32, или их части;

- более предпочтительно комплементарен или по существу комплементарен полинуклеотиду с нуклеотидной последовательностью выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 13, 16, 19, 163, 166, 169, 33, 36, 39, 42, 182, 185, 188, 191, 194, 197, 200, 203, 206, 209, 212, 215, 218, 221, 224, 227, 230, 233, 236, 239, 242, 245, 248, 251, 254, 257, 83, 86, 89, 103, 106, 109, 123,

126, 129, 143, 146, 149, 263, 266 и SEQ ID NO: 269, или их части; и

- более предпочтительно комплементарен или по существу комплементарен полинуклеотиду с нуклеотидной последовательностью выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 14, 17, 20, 164, 167, 170, 34, 37, 40, 43, 183, 186, 189, 192, 195, 198, 201, 204, 207, 210, 213, 216, 219, 222, 225, 228, 231, 234, 237, 240, 243, 246, 249, 252, 255, 258, 84, 87, 90, 104, 107, 110, 124, 127, 130, 144, 147, 150, 264, и SEQ ID NO: 270, или их части.

Изобретение дополнительно относится к антисмысловому олигонуклеотиду для перенаправления сплайсинга по любому из предшествующих пунктов, где указанный антисмысловый олигонуклеотид содержит или включает последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 15, 18, 21, 165, 168, 171, 35, 38, 41, 44, 184, 187, 190, 193, 196, 199, 202, 205, 208, 211, 214, 217, 220, 223, 226, 229, 232, 235, 238, 241, 244, 247, 250, 253, 256, 259, 85, 88, 91, 105, 108, 111, 125, 128, 131, 145, 148, 151, 265, 268 и SEQ ID NO: 271.

Изобретение дополнительно относится к вирусному вектору, экспрессирующему антисмысловый олигонуклеотид по изобретению для перенаправления сплайсинга, в условиях, которые способствуют экспрессии антисмыслового олигонуклеотида для пропуска экзонов.

Изобретение дополнительно относится к фармацевтической композиции, содержащей антисмысловый олигонуклеотид по изобретению для перенаправления сплайсинга или вирусный вектор по изобретению и фармацевтически приемлемый эксципиент.

Изобретение дополнительно относится к антисмысловому олигонуклеотиду по изобретению для перенаправления сплайсинга, вектору по изобретению и композиции по изобретению для применения в качестве лекарственного средства.

Изобретение дополнительно относится к антисмысловому олигонуклеотиду по изобретению для перенаправления сплайсинга, вектору по изобретению и композиции по изобретению для применения для лечения заболевания или состояния, связанного с АВСА4 и требующего модуляции сплайсинга АВСА4.

Изобретение дополнительно относится к применению

антисмыслового олигонуклеотида по изобретению для перенаправления сплайсинга, вектора по изобретению и композиции по изобретению для получения лекарственного средства.

Изобретение дополнительно относится к применению антисмыслового олигонуклеотида по изобретению для перенаправления сплайсинга, вектора по изобретению и композиции по изобретению для лечения заболевания или состояния, связанного с ABCA4 и требующего модуляции сплайсинга ABCA4.

Изобретение дополнительно относится к способу модуляции сплайсинга ABCA4 в клетке, включающему контакт указанной клетки с антисмысловым олигонуклеотидом по изобретению для перенаправления сплайсинга, вектором по изобретению и композицией по изобретению.

Изобретение дополнительно относится к способу лечения заболевания или состояния, связанного с ABCA4 и требующего модуляции сплайсинга ABCA4, у нуждающегося в этом индивидуума, при этом указанный способ включает контакт клетки указанного индивидуума с антисмысловым олигонуклеотидом по изобретению для перенаправления сплайсинга, вектором по изобретению и композицией по изобретению.

#### **Краткое описание чертежей**

**Фигура 1** показывает результаты примера А, где восстановление дефектов сплайсинга, вызванных мутацией ABCA4 с.4539+1100A>G и с.4539+1106C>T, проводили путем доставки АОН в анализе минигенов.

**Фигура 2** показывает результаты примера С, где восстановление при помощи АОН дефектов сплайсинга, вызванных мутацией ABCA4 с.4539+2001G>A, проводили путем доставки АОН к культивируемым клеткам-предшественникам фоторецепторов, полученным от пациента.

**Фигура 3** показывает результаты примера В; восстановление при помощи АОН дефектов сплайсинга, вызванных мутацией ABCA4 с.4539+2001G>A, проводили путем доставки АОН в анализе минигенов.

**Фигура 4 (А)** показывает результаты примера С, где идентифицировали дефекты сплайсинга, вызванные мутациями ABCA4

с.4539+2001G>A (M1) и с.4539+2028C>T (M2). Были выявлены полосы с нарушенным сплайсингом, в частности, после обработки (+) циклогексимидом (CHX). В качестве контроля использовали ОТ-ПЦР для актина (ACTB).

(В) Количественная оценка соотношения правильно и неправильно сплайсированных транскриптов *ABCA4* для каждой клеточной линии с CHX и без CHX.

**Фигура 5** Характеристика *in silico* воздействия, вызванного внутриинтронными вариантами M1 (с.4539+2001G>A) и M2 (с.4539+2028C>T). Схематически представлены границы псевдоэкзона размером 345 п.н. с расположением M1 и M2, геномные положения сайтов сплайсинга, выявленные события сплайсинга, и предсказания для сайтов сплайсинга и для акцепторных, и для донорных сайтов. Точечная линия показывает сплайсинг от криптического сайта донора сплайсинга в экзоне 30 в положении g.94495074 (GRCh37/hg19) до обычного сайта акцептора сплайсинга в экзоне 31 (r.4467\_4539del, p.Cys1490Glufs\*12). Предсказанные величины сайтов акцептора и донора сплайсинга в ситуациях контроля и мутации не показали никаких различий. На средних панелях показаны воздействия вариантов, создающих или усиливающих новые мотивы ESE. SSFL: SpliceSiteFinder-like и HSF: Human Splicing Finder.

**Фигура 6** (А) Схематическое изображение псевдоэкзона, указывающее на расположение вариантов, мотивы SC35 с наивысшими оценками и антисмысловые олигонуклеотиды (АОН). (В) Анализ РНК клеток, обработанных АОН. ОТ-ПЦР от экзона 30 до экзона 31 *ABCA4* у контроля, M1- (с.4539+2001G>A) и M2- (с.4539+2028C>T) содержащих клеток-предшественников фоторецепторов (РРС) после доставки АОН. Для нормализации образцов использовали амплификацию мРНК актина (ACTB). NT-: необработанные и в отсутствие циклогексимида (CHX); NT+: необработанные в присутствии CHX; A1: АОН1; A2: АОН2; A3: АОН3; A4: АОН4; S: SON и MQ: отрицательный контроль для ПЦР. (С) Полуколичественное соотношение правильно и неправильно сплайсированных транскриптов во всех образцах с M1 и M2. (D) Процент коррекции каждого АОН по сравнению с NT+, на основании

соотношения, наблюдаемого на фигуре 3С. Статистические различия по эффективности АОН для М1 и М2 показаны звездочкой (\*:  $p \leq 0,05$  с использованием критерия Манна-Уитни).

**фигура 7 (А)** Профиль экспрессии генов в одной контрольной и М1/М2-полученных индуцированных плюрипотентных стволовых клетках (iPSC) по сравнению с соответствующими родительскими линиями фибробластов.

**(В)** Профиль экспрессии генов в одной контрольной и М1/М2-полученных клетках-предшественниках фоторецепторов (RPC) после месяца дифференцировки по сравнению с iPSC. Появление RPC можно установить по увеличению экспрессии CRX. Дифференцировку в фоторецептор-подобные клетки показывают путем повышенной экспрессии OPN1SW, OPN1M/LW, RCV1 и ABCA4 по сравнению с геном плюрипотентности OCT3/4. Результаты показаны в виде среднего  $\pm$ SD. Все данные наносили на график относительно экспрессии ACTB.

**фигура 8** Анализ с помощью ОТ-ПЦР от экзона 2 до экзона 5 ABCA4 на контрольных (CON), М1 (с.4539+2001G>A) и М2 (с.4539+2028C>T) клетках-предшественниках фоторецепторов в отсутствие (-) и в присутствии (+) СНХ. РНК сетчатки взрослого человека использовали в качестве контроля, в то время как MQ представлял собой отрицательный контроль реакции.

На **фигуре 9** представлен скрининг 26 последовательностей АОН на их способность исправлять дефекты сплайсинга, вызванные мутацией с.4539+2001G>A. **(А)** Типичная картина электрофореза ОТ-ПЦР для детекции с 30 по 31 экзона ABCA4 у RPC, полученных у пациента. Нижняя полоса показывает правильный транскрипт, в то время как верхние полосы представляют транскрипты с нарушениями. Полосы с нарушениями были выявлены после обработки циклогексимидом (СНХ), что указывает на то, что эти транскрипты подвергаются нонсенс-опосредованной деградации (NMD). В клетки были доставлены вместе 26 различных молекул АОН, а также два SON (отрицательные контроли, которые называются SON1 и SON2). Результаты сравнивали с необработанными клетками (NT) в присутствии СНХ (+СНХ). В качестве контроля нагрузки применяли актин. MQ использовали в качестве отрицательного контроля ПЦР.



Представлен процент **(B)** правильных/исправленных транскриптов и **(C)** неправильных транскриптов после полуколичественной оценки двух независимых повторов. На основании процента молекулы АОН были классифицированы на эффективные (сплошной серый), умеренно эффективные (точечный рисунок), мало эффективные (рисунок в плоску) и неэффективные (рисунок в крестик). Сплошные, точечные и пунктирные линии указывают на пороги для определения эффективности различных АОН. Белым показаны контроли, указывающие на базовые уровни неправильных транскриптов. Черным показан образец, который не обрабатывали АОН и СНХ.

**Фигура 10** показывает скрининг АОН по семи мутациям в гене *ABCA4*, которые приводят к включению псевдоэкзона. Мидигены, содержащие геномную область, подвергали мутагенезу для вставки мутации, которая встречается у людей. Затем этими мидигенами трансфицировали клетки НЕК293Т и через 24 часа доставляли в эти клетки различные АОН. Анализ проводили путем ОТ-ПЦР. Для всех вариантов были разработаны три АОН, а в качестве отрицательного контроля доставляли SON. NT указывал на необработанные и представлял собой трансфицированные клетки без обработки АОН. Линия НЕК представляла собой дополнительный отрицательный контроль, состоящий из нетрансфицированных клеток НЕК293Т.

#### Описание последовательностей

##### **SEQ ID NO:Название:**

- 1 геномная ДНК *ABCA4*
- 2 κДНК *ABCA4*
- 3 Белок *ABCA4*
- 10 Псевдоэкзон 30-31(68) РНК
- 11 Псевдоэкзон 30-31(68) РНК; меньшая мишень
- 12 Псевдоэкзон 30-31 (68) РНК; меньшая мишень (область АОН +10)
- 13 Сайт-мишень псевдоэкзона 30-31 (68) для АОН-1 и фланкирующие последовательности (+10 н.)
- 14 Сайт-мишень псевдоэкзона 30-31 (68) для АОН-1 и фланкирующие последовательности (+5 н.)
- 15 АОН-1 для псевдоэкзона 30-31 (68)

- 16 Сайт-мишень псевдоэкзаона 30-31 (68) для АОН-2 и фланкирующие последовательности (+10 н.)
- 17 Сайт-мишень псевдоэкзаона 30-31 (68) для АОН-2 и фланкирующие последовательности (+5 н.)
- 18 АОН-2 для псевдоэкзаона 30-31 (68)
- 19 Сайт-мишень псевдоэкзаона 30-31 (68) для АОН-3 и фланкирующие последовательности (+10 н.)
- 20 Сайт-мишень псевдоэкзаона 30-31 (68) для АОН-3 и фланкирующие последовательности (+5 н.)
- 21 АОН-3 для псевдоэкзаона 30-31 (68)
- 30 Псевдоэкзаон 30-31 (345) РНК
- 31 Псевдоэкзаон 30-31 (345) РНК; меньшая мишень
- 32 Псевдоэкзаон 30-31 (345) РНК; меньшая мишень (область АОН +10)
- 33 Сайт-мишень псевдоэкзаона 30-31 (345) для АОН-1 и фланкирующие последовательности (+10 н.)
- 34 Сайт-мишень псевдоэкзаона 30-31 (345) для АОН-1 и фланкирующие последовательности (+5 н.)
- 35 АОН-1 для псевдоэкзаона 30-31 (345)
- 36 Сайт-мишень псевдоэкзаона 30-31 (345) для АОН-2 и фланкирующие последовательности (+10 н.)
- 37 Сайт-мишень псевдоэкзаона 30-31 (345) для АОН-2 и фланкирующие последовательности (+5 н.)
- 38 АОН-2 для псевдоэкзаона 30-31 (345)
- 39 Сайт-мишень псевдоэкзаона 30-31 (345) для АОН-3 и фланкирующие последовательности (+10 н.)
- 40 Сайт-мишень псевдоэкзаона 30-31 (345) для АОН-3 и фланкирующие последовательности (+5 н.)
- 41 АОН-3 для псевдоэкзаона 30-31 (345)
- 42 Сайт-мишень псевдоэкзаона 30-31 (345) для АОН-4 и фланкирующие последовательности (+10 н.)
- 43 Сайт-мишень псевдоэкзаона 30-31 (345) для АОН-4 и фланкирующие последовательности (+5 н.)
- 44 АОН-4 для псевдоэкзаона 30-31 (345)
- 45 SON-1 для псевдоэкзаона 30-31 (345), смысловая версия SEQ

- 50 pCI-Neo-Rho-ABCA4-30-31 дикого типа
- 51 pCI-Neo-Rho-ABCA4-30-31 с.4539+1100G
- 52 pCI-Neo-Rho-ABCA4-30-31 с.4539+1106T
- 53 pCI-Neo-Rho-ABCA4-30-31 с.4539+2001A
- 54 *ABCA4\_ex2* Fw
- 55 *ACTB\_ex3* Fw
- 56 *ABCA4\_ex30* Fw
- 57 *ABCA4\_ex20/21* Fw
- 58 *CRX* Fw
- 59 *LIN28* Fw
- 60 *NANOG* Fw
- 61 *OCT4* Fw
- 62 *OPN1M/LW* Fw
- 63 *OPN1SW* Fw
- 64 *RCV1* Fw
- 65 *SOX2* Fw
- 66 *ABCA4\_ex5* Rv
- 67 *ACTB\_ex4* Rv
- 68 *ABCA4\_ex31* Rv
- 69 *ABCA4\_ex21* Rv
- 70 *CRX* Rv
- 71 *LIN28* Rv
- 72 *NANOG* Rv
- 73 *OCT4* Rv
- 74 *OPN1M/LW* Rv
- 75 *OPN1SW* Rv
- 76 *RCV1* Rv
- 77 *SOX2* Rv
- 80 Псевдоэкзон 6-7 (162)
- 81 Увеличенная мишень псевдоэкзона 6-7 (162)+фланкирующие последовательности (+50 н.)
- 82 Увеличенная мишень псевдоэкзона 6-7 (162)+фланкирующие последовательности (+20 н.)
- 83 Сайт-мишень псевдоэкзона 6-7 (162) для АОН-1 и фланкирующие последовательности (+10 н.)
- 84 Сайт-мишень псевдоэкзона 6-7 (162) для АОН-1 и

фланкирующие последовательности (+5 н.)  
 85 АОН-1 для псевдоэкзамена 6-7 (162)  
 86 Сайт-мишень псевдоэкзамена 6-7 (162) для АОН-2 и  
 фланкирующие последовательности (+10 н.)  
 87 Сайт-мишень псевдоэкзамена 6-7 (162) для АОН-2 и  
 фланкирующие последовательности (+5 н.)  
 88 АОН-2 для псевдоэкзамена 6-7 (162)  
 89 Сайт-мишень псевдоэкзамена 6-7 (162) для АОН-3 и  
 фланкирующие последовательности (+10 н.)  
 90 Сайт-мишень псевдоэкзамена 6-7 (162) для АОН-3 и  
 фланкирующие последовательности (+5 н.)  
 91 АОН-3 для псевдоэкзамена 6-7 (162)  
 100 Псевдоэкзамен 7-8 (141)  
 101 Увеличенная мишень псевдоэкзамена 7-8 (141)+фланкирующие  
 последовательности (+50 н.)  
 102 Увеличенная мишень псевдоэкзамена 7-8 (141)+фланкирующие  
 последовательности (+20 н.)  
 103 Сайт-мишень псевдоэкзамена 7-8 (141) для АОН-1 и  
 фланкирующие последовательности (+10 н.)  
 104 Сайт-мишень псевдоэкзамена 7-8 (141) для АОН-1 и  
 фланкирующие последовательности (+5 н.)  
 105 АОН-1 для псевдоэкзамена 7-8 (141)  
 106 Сайт-мишень псевдоэкзамена 7-8 (141) для АОН-2 и  
 фланкирующие последовательности (+10 н.)  
 107 Сайт-мишень псевдоэкзамена 7-8 (141) для АОН-2 и  
 фланкирующие последовательности (+5 н.)  
 108 АОН-2 для псевдоэкзамена 7-8 (141)  
 109 Сайт-мишень псевдоэкзамена 7-8 (141) для АОН-3 и  
 фланкирующие последовательности (+10 н.)  
 110 Сайт-мишень псевдоэкзамена 7-8 (141) для АОН-3 и  
 фланкирующие последовательности (+5 н.)  
 111 АОН-3 для псевдоэкзамена 7-8 (141)  
 120 Псевдоэкзамен 7-8 (56)  
 121 Увеличенная мишень псевдоэкзамена 7-8 (56)+фланкирующие  
 последовательности (+50 н.)  
 122 Увеличенная мишень псевдоэкзамена 7-8 (56)+фланкирующие

последовательности (+20 н.)

123 Сайт-мишень псевдоэкза 7-8 (56) для АОН-1 и  
фланкирующие последовательности (+10 н.)

124 Сайт-мишень псевдоэкза 7-8 (56) для АОН-1 и  
фланкирующие последовательности (+5 н.)

125 АОН-1 для псевдоэкза 7-8 (56)

126 Сайт-мишень псевдоэкза 7-8 (56) для АОН-2 и  
фланкирующие последовательности (+10 н.)

127 Сайт-мишень псевдоэкза 7-8 (56) для АОН-2 и  
фланкирующие последовательности (+5 н.)

128 АОН-2 для псевдоэкза 7-8 (56)

129 Сайт-мишень псевдоэкза 7-8 (56) для АОН-3 и  
фланкирующие последовательности (+10 н.)

130 Сайт-мишень псевдоэкза 7-8 (56) для АОН-3 и  
фланкирующие последовательности (+5 н.)

131 АОН-3 для псевдоэкза 7-8 (56)

140 Псевдоэкза 13-14 (134)

141 Увеличенная мишень псевдоэкза 13-14  
(134)+фланкирующие последовательности (+50 н.)

142 Увеличенная мишень псевдоэкза 13-14  
(134)+фланкирующие последовательности (+20 н.)

143 Сайт-мишень псевдоэкза 13-14 (134) для АОН-1 и  
фланкирующие последовательности (+10 н.)

144 Сайт-мишень псевдоэкза 13-14 (134) для АОН-1 и  
фланкирующие последовательности (+5 н.)

145 АОН-1 для псевдоэкза 13-14 (134)

146 Сайт-мишень псевдоэкза 13-14 (134) для АОН-2 и  
фланкирующие последовательности (+10 н.)

147 Сайт-мишень псевдоэкза 13-14 (134) для АОН-2 и  
фланкирующие последовательности (+5 н.)

148 АОН-2 для псевдоэкза 13-14 (134)

149 Сайт-мишень псевдоэкза 13-14 (134) для АОН-3 и  
фланкирующие последовательности (+10 н.)

150 Сайт-мишень псевдоэкза 13-14 (134) для АОН-3 и  
фланкирующие последовательности (+5 н.)

151 АОН-3 для псевдоэкза 13-14 (134)

- 160 Псевдоэкзон 30-31 (68)
- 161 Увеличенная мишень псевдоэкзона 30-31 (68)+фланкирующие последовательности (+50 н.)
- 162 Увеличенная мишень псевдоэкзона 30-31 (68)+фланкирующие последовательности (+20 н.)
- 163 Сайт-мишень псевдоэкзона 30-31 (68) для АОН-1 и фланкирующие последовательности (+10 н.)
- 164 Сайт-мишень псевдоэкзона 30-31 (68) для АОН-1 и фланкирующие последовательности (+5 н.)
- 165 АОН-1 для псевдоэкзона 30-31 (68)
- 166 Сайт-мишень псевдоэкзона 30-31 (68) для АОН-2 и фланкирующие последовательности (+10 н.)
- 167 Сайт-мишень псевдоэкзона 30-31 (68) для АОН-2 и фланкирующие последовательности (+5 н.)
- 168 АОН-2 для псевдоэкзона 30-31 (68)
- 169 Сайт-мишень псевдоэкзона 30-31 (68) для АОН-3 и фланкирующие последовательности (+10 н.)
- 170 Сайт-мишень псевдоэкзона 30-31 (68) для АОН-3 и фланкирующие последовательности (+5 н.)
- 171 АОН-3 для псевдоэкзона 30-31 (68)
- 180 Псевдоэкзон 30-31 (345)
- 181 Увеличенная мишень псевдоэкзона 30-31 (345)+фланкирующие последовательности (+20 н.)
- 182 Сайт-мишень псевдоэкзона 30-31 (345) для АОН-1 и фланкирующие последовательности (+10 н.)
- 183 Сайт-мишень псевдоэкзона 30-31 (345) для АОН-1 и фланкирующие последовательности (+5 н.)
- 184 АОН-1 для псевдоэкзона 30-31 (345)
- 185 Сайт-мишень псевдоэкзона 30-31 (345) для АОН-2 и фланкирующие последовательности (+10 н.)
- 186 Сайт-мишень псевдоэкзона 30-31 (345) для АОН-2 и фланкирующие последовательности (+5 н.)
- 187 АОН-2 для псевдоэкзона 30-31 (345)
- 188 Сайт-мишень псевдоэкзона 30-31 (345) для АОН-3 и фланкирующие последовательности (+10 н.)
- 189 Сайт-мишень псевдоэкзона 30-31 (345) для АОН-3 и

фланкирующие последовательности (+5 н.)  
190 АОН-3 для псевдоэкза 30-31 (345)  
191 Сайт-мишень псевдоэкза 30-31 (345) для АОН-4 и  
фланкирующие последовательности (+10 н.)  
192 Сайт-мишень псевдоэкза 30-31 (345) для АОН-4 и  
фланкирующие последовательности (+5 н.)  
193 АОН-4 для псевдоэкза 30-31 (345)  
194 Сайт-мишень псевдоэкза 30-31 (345) для АОН-5 и  
фланкирующие последовательности (+10 н.)  
195 Сайт-мишень псевдоэкза 30-31 (345) для АОН-5 и  
фланкирующие последовательности (+5 н.)  
196 АОН-5 для псевдоэкза 30-31 (345)  
197 Сайт-мишень псевдоэкза 30-31 (345) для АОН-6 и  
фланкирующие последовательности (+10 н.)  
198 Сайт-мишень псевдоэкза 30-31 (345) для АОН-6 и  
фланкирующие последовательности (+5 н.)  
199 АОН-6 для псевдоэкза 30-31 (345)  
200 Сайт-мишень псевдоэкза 30-31 (345) для АОН-7 и  
фланкирующие последовательности (+10 н.)  
201 Сайт-мишень псевдоэкза 30-31 (345) для АОН-7 и  
фланкирующие последовательности (+5 н.)  
202 АОН-7 для псевдоэкза 30-31 (345)  
203 Сайт-мишень псевдоэкза 30-31 (345) для АОН-8 и  
фланкирующие последовательности (+10 н.)  
204 Сайт-мишень псевдоэкза 30-31 (345) для АОН-8 и  
фланкирующие последовательности (+5 н.)  
205 АОН-8 для псевдоэкза 30-31 (345)  
206 Сайт-мишень псевдоэкза 30-31 (345) для АОН-9 и  
фланкирующие последовательности (+10 н.)  
207 Сайт-мишень псевдоэкза 30-31 (345) для АОН-9 и  
фланкирующие последовательности (+5 н.)  
208 АОН-9 для псевдоэкза 30-31 (345)  
209 Сайт-мишень псевдоэкза 30-31 (345) для АОН-10 и  
фланкирующие последовательности (+10 н.)  
210 Сайт-мишень псевдоэкза 30-31 (345) для АОН-10 и  
фланкирующие последовательности (+5 н.)

- 211 АОН-10 для псевдоэкзамена 30-31 (345)
- 212 Сайт-мишень псевдоэкзамена 30-31 (345) для АОН-11 и фланкирующие последовательности (+10 н.)
- 213 Сайт-мишень псевдоэкзамена 30-31 (345) для АОН-11 и фланкирующие последовательности (+5 н.)
- 214 АОН-11 для псевдоэкзамена 30-31 (345)
- 215 Сайт-мишень псевдоэкзамена 30-31 (345) для АОН-12 и фланкирующие последовательности (+10 н.)
- 216 Сайт-мишень псевдоэкзамена 30-31 (345) для АОН-12 и фланкирующие последовательности (+5 н.)
- 217 АОН-12 для псевдоэкзамена 30-31 (345)
- 218 Сайт-мишень псевдоэкзамена 30-31 (345) для АОН-13 и фланкирующие последовательности (+10 н.)
- 219 Сайт-мишень псевдоэкзамена 30-31 (345) для АОН-13 и фланкирующие последовательности (+5 н.)
- 220 АОН-13 для псевдоэкзамена 30-31 (345)
- 221 Сайт-мишень псевдоэкзамена 30-31 (345) для АОН-14 и фланкирующие последовательности (+10 н.)
- 222 Сайт-мишень псевдоэкзамена 30-31 (345) для АОН-14 и фланкирующие последовательности (+5 н.)
- 223 АОН-14 для псевдоэкзамена 30-31 (345)
- 224 Сайт-мишень псевдоэкзамена 30-31 (345) для АОН-15 и фланкирующие последовательности (+10 н.)
- 225 Сайт-мишень псевдоэкзамена 30-31 (345) для АОН-15 и фланкирующие последовательности (+5 н.)
- 226 АОН-15 для псевдоэкзамена 30-31 (345)
- 227 Сайт-мишень псевдоэкзамена 30-31 (345) для АОН-16 и фланкирующие последовательности (+10 н.)
- 228 Сайт-мишень псевдоэкзамена 30-31 (345) для АОН-16 и фланкирующие последовательности (+5 н.)
- 229 АОН-16 для псевдоэкзамена 30-31 (345)
- 230 Сайт-мишень псевдоэкзамена 30-31 (345) для АОН-17 и фланкирующие последовательности (+10 н.)
- 231 Сайт-мишень псевдоэкзамена 30-31 (345) для АОН-17 и фланкирующие последовательности (+5 н.)
- 232 АОН-17 для псевдоэкзамена 30-31 (345)



- 233 Сайт-мишень псевдоэкзаона 30-31 (345) для АОН-18 и фланкирующие последовательности (+10 н.)
- 234 Сайт-мишень псевдоэкзаона 30-31 (345) для АОН-18 и фланкирующие последовательности (+5 н.)
- 235 АОН-18 для псевдоэкзаона 30-31 (345)
- 236 Сайт-мишень псевдоэкзаона 30-31 (345) для АОН-19 и фланкирующие последовательности (+10 н.)
- 237 Сайт-мишень псевдоэкзаона 30-31 (345) для АОН-19 и фланкирующие последовательности (+5 н.)
- 238 АОН-19 для псевдоэкзаона 30-31 (345)
- 239 Сайт-мишень псевдоэкзаона 30-31 (345) для АОН-20 и фланкирующие последовательности (+10 н.)
- 240 Сайт-мишень псевдоэкзаона 30-31 (345) для АОН-20 и фланкирующие последовательности (+5 н.)
- 241 АОН-20 для псевдоэкзаона 30-31 (345)
- 242 Сайт-мишень псевдоэкзаона 30-31 (345) для АОН-21 и фланкирующие последовательности (+10 н.)
- 243 Сайт-мишень псевдоэкзаона 30-31 (345) для АОН-21 и фланкирующие последовательности (+5 н.)
- 244 АОН-21 для псевдоэкзаона 30-31 (345)
- 245 Сайт-мишень псевдоэкзаона 30-31 (345) для АОН-22 и фланкирующие последовательности (+10 н.)
- 246 Сайт-мишень псевдоэкзаона 30-31 (345) для АОН-22 и фланкирующие последовательности (+5 н.)
- 247 АОН-22 для псевдоэкзаона 30-31 (345)
- 248 Сайт-мишень псевдоэкзаона 30-31 (345) для АОН-23 и фланкирующие последовательности (+10 н.)
- 249 Сайт-мишень псевдоэкзаона 30-31 (345) для АОН-23 и фланкирующие последовательности (+5 н.)
- 250 АОН-23 для псевдоэкзаона 30-31 (345)
- 251 Сайт-мишень псевдоэкзаона 30-31 (345) для АОН-24 и фланкирующие последовательности (+10 н.)
- 252 Сайт-мишень псевдоэкзаона 30-31 (345) для АОН-24 и фланкирующие последовательности (+5 н.)
- 253 АОН-24 для псевдоэкзаона 30-31 (345)
- 254 Сайт-мишень псевдоэкзаона 30-31 (345) для АОН-25 и

- фланкирующие последовательности (+10 н.)
- 255 Сайт-мишень псевдоэкзона 30-31 (345) для АОН-25 и фланкирующие последовательности (+5 н.)
- 256 АОН-25 для псевдоэкзона 30-31 (345)
- 257 Сайт-мишень псевдоэкзона 30-31 (345) для АОН-26 и фланкирующие последовательности (+10 н.)
- 258 Сайт-мишень псевдоэкзона 30-31 (345) для АОН-26 и фланкирующие последовательности (+5 н.)
- 259 АОН-26 для псевдоэкзона 30-31 (345)
- 260 Псевдоэкзон 36-37 (188)
- 261 Увеличенная мишень псевдоэкзона 36-37 (188)+фланкирующие последовательности (+50 н.)
- 262 Увеличенная мишень псевдоэкзона 36-37 (188)+фланкирующие последовательности (+20 н.)
- 263 Сайт-мишень псевдоэкзона 36-37 (188) для АОН-1 и фланкирующие последовательности (+10 н.)
- 264 Сайт-мишень псевдоэкзона 36-37 (188) для АОН-1 и фланкирующие последовательности (+5 н.)
- 265 АОН-1 для псевдоэкзона 36-37 (188)
- 266 Сайт-мишень псевдоэкзона 36-37 (188) для АОН-2 и фланкирующие последовательности (+10 н.)
- 267 Сайт-мишень псевдоэкзона 36-37 (188) для АОН-2 и фланкирующие последовательности (+5 н.)
- 268 АОН-2 для псевдоэкзона 36-37 (188)
- 269 Сайт-мишень псевдоэкзона 36-37 (188) для АОН-3 и фланкирующие последовательности (+10 н.)
- 270 Сайт-мишень псевдоэкзона 36-37 (188) для АОН-3 и фланкирующие последовательности (+5 н.)
- 271 АОН-3 для псевдоэкзона 36-37 (188)
- 280 SON-1 (с.4539+2001G>A, смысловая версия АОН1 30-31 (345))
- 281 SON-2 (с.4539+2001G>A, смысловая версия АОН4 30-31 (345))
- 282 SON-3 (с.1937+435C>G, смысловая версия АОН2 13-14 (134))
- 290 pCI-Neo-Rho-ABCA4-intron6-intron7 дикого типа

291 pCI-Neo-Rho-ABCA4-intron6-intron7 с.769-784Т  
 292 pCI-Neo-Rho-ABCA4-intron6-intron11 дикого типа  
 293 pCI-Neo-Rho-ABCA4-intron6-intron11 с.859-540G  
 294 pCI-Neo-Rho-ABCA4-intron6-intron11 с.859-506С  
 295 pCI-Neo-Rho-ABCA4-intron11-intron15 дикого типа  
 296 pCI-Neo-Rho-ABCA4-intron11-intron15 с.1937+435G  
 297 pCI-Neo-Rho-ABCA4-intron29-intron32 дикого типа  
 298 pCI-Neo-Rho-ABCA4-intron29-intron32 с.4539+1100G  
 299 pCI-Neo-Rho-ABCA4-intron29-intron32 с.4539+1106Т  
 300 pCI-Neo-Rho-ABCA4-intron31-intron37 дикого типа  
 301 pCI-Neo-Rho-ABCA4-intron31-intron37 с.5197-557Т  
 302 *RHO\_ex3* fw  
 303 *ABCA4\_ex7* rev  
 304 *ABCA4\_ex7* fw  
 305 *ABCA4\_ex8* rev  
 306 *ABCA4\_ex13* fw  
 307 *ABCA4\_ex14* rev  
 308 *ABCA4\_ex30* fw  
 309 *ABCA4\_ex32* rev  
 310 *ABCA4\_ex32* fw  
 311 *ABCA4\_ex37* rev

**Таблица 1 - Характеристики антисмысловых олигонуклеотидов (АОН)**

Название	SEQ ID NO:	Последовательность 5'→3'	Длина	% GC	Tm (°C)
АОН-1 для псевдоэкзона 30-31 (68)	15/165	GUAAUCUGUUCUGGACUU	18	39	43,5
АОН-2 для псевдоэкзона 30-31 (68)	18/168	UAGAACUCCCAGGACAGG	18	56	50,3
АОН-3 для псевдоэкзона 30-31 (68)	21/171	CUAAAUCCCCCAGGAGAU	18	50	48
АОН-1 для	85	GAUGGAAUCACUGAUCCUAG	20	45	49,7

псевдоэкзона 6-7 (162)					
АОН-2 для псевдоэкзона 6-7 (162)	88	AGCUCCAGAGACUGAUGUGA	20	50	51,8
АОН-3 для псевдоэкзона 6-7 (162)	91	CUCACCACUGCUCCUGC	17	65	51,9
АОН-1 для псевдоэкзона 7-8 (141)	105	CCCACCAAGAUGGGGAUACU	20	55	53,8
АОН-2 для псевдоэкзона 7-8 (141)	108	GGUUCUGUUGUCCCACCAAG	20	55	53,8
АОН-3 для псевдоэкзона 7-8 (141)	111	CAAUCCACAGACUGACCCCU	20	50	51,8
АОН-1 для псевдоэкзона 7-8 (56)	125	GACUGAGCAAUACUCCGUC	19	53	51,1
АОН-2 для псевдоэкзона 7-8 (56)	128	AUCACAGAGUGACCCCUAG	19	53	51,1
АОН-3 для псевдоэкзона 7-8 (56)	131	CUGAGCAAUACUCCGUC <u>G</u>	19	53	51,1
АОН-1 для псевдоэкзона 13-14 (134)	145	CUCCCAGGAACCAGACCUA	19	58	53,2
АОН-2 для псевдоэкзона 13-14 (134)	148	GCUCAUCCAACACAUCCUC	20	50	51,8
АОН-3 для псевдоэкзона 13-14 (134)	151	CCUGGGAUGGGAGUGUC	17	65	51,9

АОН-1 для псевдоэкзона 30-31 (345)	35/184	ACAGGAG <u>U</u> CCUCAGCAUUG	19	53	51,1
АОН-2 для псевдоэкзона 30-31 (345)	38/187	UUUUGUCCAGGGACCAAGG	19	53	51,1
АОН-3 для псевдоэкзона 30-31 (345)	41/190	CUGUUACAUUUUGUCCAGG	19	42	46,8
АОН-4 для псевдоэкзона 30-31 (345)	44/193	GGGGCACAGAGGACUGAGA	19	63	55,4
АОН-5 для псевдоэкзона 30-31 (345)	196	GAGAGAAAUAUUGCUUGAG AA	22	32	47,4
АОН-6 для псевдоэкзона 30-31 (345)	199	GCAGAUGAGCUGUGAUUCA	20	45	49,7
АОН-7 для псевдоэкзона 30-31 (345)	202	UAUGAUGCAGCAGAUGAGCU G	21	48	52,4
АОН-8 для псевдоэкзона 30-31 (345)	205	UGGGAUCCCUAUGAUGCAGC	20	55	53,8
АОН-9 для псевдоэкзона 30-31 (345)	208	AGAGGACUGAGACAAGUCC	20	50	51,8
АОН-10 для псевдоэкзона 30-31 (345)	211	GCUUCCUCUUGGGGCACAGA	20	60	55,9
АОН-11 для псевдоэкзона 30-31 (345)	214	CCUCAGCAUUGACAGCAA	18	50	48
АОН-12 для псевдоэкзона	217	ACAGGAGCCCUCAGCAUUG	19	58	53,2

30-31 (345)					
АОН-13 для псевдоэкзона 30-31 (345)	220	UGGAGGCAGCCACAGGAG	18	67	54,9
АОН-14 для псевдоэкзона 30-31 (345)	223	GAUGCUGGAGGGUUUUGAGU G	21	52	54,4
АОН-15 для псевдоэкзона 30-31 (345)	226	GAUGCUGG <u>A</u> GAGUUUUGAGU G	21	48	52,4
АОН-16 для псевдоэкзона 30-31 (345)	229	GCCUUGACGUCCUGAUGCU	19	58	53,2
АОН-17 для псевдоэкзона 30-31 (345)	232	GCCAAGAGCUCAGGGUACAG	20	60	55,9
АОН-18 для псевдоэкзона 30-31 (345)	235	CUUGGCCUCCCCUCCCUC	18	72	57,2
АОН-19 для псевдоэкзона 30-31 (345)	238	AACACCAUGUAGGUAGGC	18	50	48
АОН-20 для псевдоэкзона 30-31 (345)	241	GUUUAGGAAUGAAACACCA UG	22	36	49,2
АОН-21 для псевдоэкзона 30-31 (345)	244	GACCGCGUGGAAGUAAGG	18	61	52,6
АОН-22 для псевдоэкзона 30-31 (345)	247	AUAAGUUUCUAAGCUGGACA G	21	38	48,5
АОН-23 для псевдоэкзона 30-31 (345)	250	GGACCAAGGACCAACACUAC	20	55	53,8
АОН-24 для псевдоэкзона 30-31 (345)	253	GGCUGUUACAUUUUGUCCAG	21	48	52,4

псевдоэкзона 30-31 (345)		G			
АОН-25 для псевдоэкзона 30-31 (345)	256	GGCAGGAACUGGCUUGCCUU	20	60	55,9
АОН-26 для псевдоэкзона 30-31 (345)	259	AGAAGUGAAAGAAAAUGGCA GG	22	41	51,1
АОН-1 для псевдоэкзона 36-37 (188)	265	CAGAGUUGGGCACUGUUC	18	56	50,3
АОН-2 для псевдоэкзона 36-37 (188)	268	GGCUGAUCUGGUGCAGG	17	65	51,9
АОН-3 для псевдоэкзона 36-37 (188)	271	CUUACAGGAGGCUGAUCUG	19	53	51,1
SON-1 для псевдоэкзона 30-31 (345)	45/280	CAAUGCUGAGG <u>A</u> CUCCUGU Смысловая версия АОН-1 (SEQ ID NO: 35/184)	19	53	51,1
SON-2 для псевдоэкзона 30-31 (345)	281	UCUCAGUCCUCUGUGCCCC Смысловая версия АОН-4 (SEQ ID NO: 44/193)	19	63	55,4
SON-3 для псевдоэкзона 13-14 (134)	282	GAGGAAUGUGUUGGAUGAGC Смысловая версия АОН-2 (SEQ ID NO: 148)	20	50	51,8

Некоторые мутации расположены внутри псевдоэкзона (например, когда мутация создает экзонный энхансер сплайсинга (ESE), который в свою очередь создает псевдоэкзон, мутация будет частью псевдоэкзона) АОН, сконструированные для перенаправления сплайсинга, будут иметь нарушение комплементарности в сайте мутации относительно последовательности дикого типа. Это

касается АОН с SEQ ID NO: 35/184, 131 и 226 и SON с SEQ ID NO: 45/280; мутация относительно последовательности дикого типа выделена жирным шрифтом и подчеркнута.

**Таблица 2 - Дополнительная информация по АОН для псевдоэкзона 30-31 (345)**

АОН #	Область-мишень	SF2	SC35	SRp40	SRp55	Тип области	Другие примечания
5	интрон	0	0	1	0	Смешанная	
6	акцептор	1	1	1	2	Смешанная	
7	акцептор	1	1	2	2	Смешанная	
8	Псевдоэкзон (ПЭ)	0	2	2	2	Смешанная	
9	ПЭ	0	1	2	0	Смешанная	Частично перекрывается с АОН4
4	ПЭ	1	3	3	0	Смешанная	
10	ПЭ	2	3	1	0	Смешанная	Частично перекрывается с АОН4
11	ПЭ	1	1	1	1	Смешанная	Частично перекрывается с АОН1
1	ПЭ	1	1	2	2	Смешанная	Специфичный для с.4539+2001 G>A
12	ПЭ	1	1	2	1	Смешанная	Версия дикого типа для АОН1
13	ПЭ	0	2	2	2	Смешанная	Частично перекрывается с АОН1
14	ПЭ	1	1	2	1	Закрытая/Открытая	Версия дикого типа для АОН15
15	ПЭ	1	1	2	1	Закрытая/Открытая	Специфичный для



							с.4539+2028 С>Т
16	ПЭ	1	0	1	2	Смешанная	
17	ПЭ	0	4	0	0	Закрытая/Открытая	
18	ПЭ	1	0	0	0	Закрытая/Открытая	
19	ПЭ	0	0	1	2	Закрытая/Открытая	
20	ПЭ	0	1	2	1	Закрытая/Открытая	
21	ПЭ	1	1	3	1	Смешанная	
22	ПЭ	0	0	0	0	Смешанная	
23	ПЭ	0	2	2	0	Смешанная	
2	ПЭ	1	2	0	0	Смешанная	
3	ПЭ	1	1	2	0	Смешанная	
24	ПЭ	1	1	2	0	Смешанная	Аналогичный АОНЗ, но длиннее на 3 нуклеотида
25	Донорный сайт	0	1	0	0	Смешанная	
26	Интрон	0	2	2	0	Смешанная	

**Таблица 2** описывает характеристики 26 АОН, которые тестировали на их эффективность перенаправлять включение ПЭ из-за замены с.4539+2001G>A. АОН перечислены от 5'- к 3'-концу псевдоэкзона. Колонка 2 показывает положение относительно ПЭ. Колонки с 3 до 6 показывают число предсказанных мотивов экзонных энхансеров сплайсинга, т.е. SF2, SC35, SRp40 и SRp55, которые перекрываются соответствующими АОН. Колонка 7 показывает конфигурацию РНК в положении АОН, т.е. открытую, закрытую или смешанную конфигурацию.

#### **Подробное описание изобретения**

По определению, АОН по существу являются комплементарными (антисмысловыми) по отношению к мишени, что позволяет им связываться с соответствующей молекулой пре-мРНК, таким образом

предотвращая связывание белков, необходимых для сплайсинга. Как правило, такое отсутствие связывания приводит к пропуску целевого экзона, как было показано ранее авторами настоящего изобретения для мутации с.2991+1655A>G в *CEP290* (Collin et al., 2012; Garanto et al., 2016). Кроме того, АОН могут перенаправлять аппарат сплайсинга по направлению к соседним сайтам акцептора или донора сплайсинга. Это привело авторов изобретения к отбору мутаций *ABCA4*, которые также могут поддаваться терапии путем регуляции сплайсинга на основе АОН. Эти мутации представляют собой варианты глубоко в интронных областях, которые создают новые участки связывания акцептора сплайсинга, донора сплайсинга или экзонного энхансера сплайсинга, и приводят к включению псевдоэкзонов в мРНК соответствующего гена. АОН будут использоваться для блокирования распознавания псевдоэкзона (и следовательно индуцировать его пропуск), таким образом полностью восстанавливая транскрипт дикого типа и функцию соответствующего белка. Были отобраны следующие мутации:

- с.769-784C>T. Эта мутация приводит к вставке псевдоэкзона размером 162 н. между экзонами 6 и 7 *ABCA4*.

- с.859-540C>G. Эта мутация приводит к вставке псевдоэкзона размером 141 н. между экзонами 7 и 8 *ABCA4*.

- с.859-506G>C. Эта мутация приводит к вставке псевдоэкзона размером 56 н. между экзонами 7 и 8 *ABCA4*.

- с.1937+435C>G. Эта мутация приводит к вставке псевдоэкзона размером 134 н. между экзонами 13 и 14 *ABCA4*.

- с.4539+1100A>G и с.4539+1106C>T. Эти мутации приводят к одинаковой вставке псевдоэкзона размером 68 н. между экзонами 30 и 31 *ABCA4* и их можно, таким образом, подвергать воздействию одинаковых АОН.

- с.4539+2001G>A и с.4539+2028C>T. Эти мутации приводят к одинаковой вставке псевдоэкзона размером 345 н. между экзонами 30 и 31 *ABCA4* и их можно, таким образом, подвергать воздействию одинаковых АОН.

- с.5197-557G>T. Эта мутация приводит к вставке псевдоэкзона

размером 188 н. между экзонами 36 и 37 ABCA4.

Авторы изобретения предлагают АОН для регуляции сплайсинга для вышеперечисленных классов мутаций; термины «регуляция сплайсинга» и «перенаправить сплайсинг» используются в настоящем документе взаимозаменяемо и включают в себя терапию путем регуляции сплайсинга на основе АОН для вышеперечисленных мутаций.

Таким образом, настоящее изобретение относится к антисмысловому олигонуклеотиду для перенаправления сплайсинга, который:

- комплементарен или по существу комплементарен полинуклеотиду с нуклеотидной последовательностью, состоящей из SEQ ID NO: 10, 161, 30, 81, 101, 121, 141 или SEQ ID NO: 261, или их части;

- предпочтительно комплементарен или по существу комплементарен полинуклеотиду с нуклеотидной последовательностью, состоящей из SEQ ID NO: 162, 181, 82, 102, 122, 142 или SEQ ID NO: 262, или их части;

- более предпочтительно комплементарен или по существу комплементарен полинуклеотиду с нуклеотидной последовательностью, состоящей из SEQ ID NO: 160, 180, 80, 100, 120, 140 или SEQ ID NO: 260, или их части

- более предпочтительно комплементарен или по существу комплементарен полинуклеотиду с нуклеотидной последовательностью, состоящей из SEQ ID NO: 11 или SEQ ID NO: 31, или их части;

- более предпочтительно комплементарен или по существу комплементарен полинуклеотиду с нуклеотидной последовательностью, состоящей из SEQ ID NO: 12 или SEQ ID NO: 32, или их части;

- более предпочтительно комплементарен или по существу комплементарен полинуклеотиду с нуклеотидной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 13, 16, 19, 163, 166, 169, 33, 36, 39, 42, 182, 185, 188, 191, 194, 197, 200, 203, 206, 209, 212, 215, 218, 221, 224, 227, 230, 233, 236, 239, 242, 245, 248, 251, 254, 257, 83, 86, 89,

103, 106, 109, 123, 126, 129, 143, 146, 149, 263, 266 и SEQ ID NO: 269, или их части; и

- более предпочтительно комплементарен или по существу комплементарен полинуклеотиду с нуклеотидной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 14, 17, 20, 164, 167, 170, 34, 37, 40, 43, 183, 186, 189, 192, 195, 198, 201, 204, 207, 210, 213, 216, 219, 222, 225, 228, 231, 234, 237, 240, 243, 246, 249, 252, 255, 258, 84, 87, 90, 104, 107, 110, 124, 127, 130, 144, 147, 150, 264, 268 и SEQ ID NO: 270, или их части.

В настоящем документе, упоминается «SEQ ID NO: 10, 161, 30, 81, 101, 121, 141 и SEQ ID NO: 261, или их части». В контексте изобретения:

SEQ ID NO: 11, 12, 13, 14, 16, 17, 19, 201, 60, 162, 163, 164, 166, 167, 169 и 170 или их части, каждая является предпочтительной частью SEQ ID NO: 10 и 161;

SEQ ID NO: 181, 180, 31, 32, 33, 34, 36, 37, 39, 40, 42, 43, 182, 185, 188, 191, 194, 197, 200, 203, 206, 209, 212, 215, 218, 221, 224, 227, 230, 233, 236, 239, 242, 245, 248, 251, 254, 257, 183, 186, 189, 192, 195, 198, 201, 204, 207, 210, 213, 216, 219, 222, 225, 228, 231, 234, 237, 240, 243, 246, 249, 252, 255 и 258 или их части, каждая является предпочтительной частью SEQ ID NO: 30;

SEQ ID NO: 82, 80, 83, 86, 89, 84, 87 и 90 или их части, каждая является предпочтительной частью SEQ ID NO: 81;

SEQ ID NO: 102, 100, 103, 106, 109, 104, 107 и 110 или их части, каждая является предпочтительной частью SEQ ID NO: 10;

SEQ ID NO: 122, 120, 123, 126, 129, 124, 127 и 130 или их части, каждая является предпочтительной частью SEQ ID NO: 121;

SEQ ID NO: 142, 140, 143, 146, 149, 144, 147 и 150 или их части, каждая является предпочтительной частью SEQ ID NO: 141;

SEQ ID NO: 262, 260, 263, 266, 269, 264, 267 и 270 или их части, каждая является предпочтительной частью SEQ ID NO: 261.

Термин «пропуск экзона» в настоящем документе определяют как индукцию, выработку или повышенную выработку в клетке зрелой мРНК, не содержащей конкретный экзон, который мог бы

присутствовать в зрелой мРНК без пропуска экзона. Пропуск экзона получают путем снабжения клетки, экспрессирующей пре-мРНК указанной зрелой мРНК, молекулой, способной создавать помехи для последовательностей, таких как, например, последовательность (криптического) донора сплайсинга или (криптического) акцептора сплайсинга, необходимая для ферментативного процесса сплайсинга, или молекулой, которая способна создавать помехи для сигнала включения экзона, необходимого для распознавания участка нуклеотидов как экзона, который должен быть включен в зрелую мРНК; такие молекулы в настоящем документе обозначают как молекулы для пропуска экзона. Термин пре-мРНК относится к непротранскрибированному или частично протранскрибированному предшественнику мРНК, который синтезируется путем транскрипции с матрицы ДНК в клетке, а именно, в ядре.

Термин «сохранение экзона» в настоящем документе в настоящем документе определяют как индукцию, выработку или повышенную выработку в клетке зрелой мРНК, содержащей конкретный экзон, который должен присутствовать в зрелой мРНК без удаления (неправильного) экзона. Сохранение экзона получают путем снабжения клетки, экспрессирующей пре-мРНК, указанной зрелой мРНК, молекулой АОН, способной создавать помеху последовательностям, таким как, например, альтернативные сайты сплайсинга, расположенные до или после обычных сайтов сплайсинга. Термин "антисмысловой олигонуклеотид" или «АОН» понимают, как относящийся к олигонуклеотидной молекуле, содержащей нуклеотидную последовательность, которая по существу комплементарна нуклеотидной последовательности-мишени в молекуле пре-мРНК, гЯРНК (гетерогенной ядерной РНК) или молекуле мРНК. Степень комплементарности (или комплементарность по существу) антисмысловой последовательности предпочтительно такова, что молекула, содержащая антисмысловую последовательность, может формировать стабильный гибрид с нуклеотидной последовательностью-мишенью в молекуле РНК в физиологических условиях.

Термины "антисмысловой олигонуклеотид", «АОН» и "олигонуклеотид" в настоящем документе используют

взаимозаменяемо и понимают, как относящиеся к олигонуклеотиду, содержащему антисмысловую последовательность. Специалист в данной области может с легкостью оценить связывание АОН со своей мишенью при помощи способов, известных в данной области, таких как анализ изменения подвижности геля, описанный в EP1619249. Термин "по существу комплементарный" при использовании в контексте изобретения указывает, что допускаются некоторые нарушения комплементарности в антисмысловой последовательности при условии сохранения функциональности, т.е. индуцирования пропуска экзона или сохранения экзона. Предпочтительно, комплементарность составляет от 90% до 100%. В основном допускается 1 или 2 нарушения комплементарности в АОН из 20 нуклеотидов или 1, 2, 3 или 4 нарушения комплементарности в АОН из 40 нуклеотидов, или 1, 2, 3, 4, 5 или 6 нарушения комплементарности в АОН из 60 нуклеотидов, и т.д. Необязательно, указанный АОН можно дополнительно тестировать путем трансфекции клеток сетчатки пациентов. Пропуск экзона или сохранение экзона можно оценивать путем ОТ-ПЦР (такой, например, как описанная в EP1619249). Комплементарные области предпочтительно сконструированы таким образом, что в сочетании они являются специфичными для экзона пре-мРНК. Такую специфичность можно создать при помощи различных длин комплементарных областей, поскольку она зависит от фактических последовательностей в других молекулах (пре-)мРНК в системе. Риск того, что АОН будет также способен гибридизироваться с одной или несколькими другими молекулами пре-мРНК снижается с увеличением размера АОН. Очевидно, что АОН, содержащие нарушения комплементарности в области комплементарности, но сохраняющие способность гибридизироваться и/или связываться с целевой областью/областями в пре-мРНК, можно использовать в изобретении. Однако, предпочтительно, по меньшей мере, комплементарные части не содержат такие нарушения комплементарности, поскольку АОН без нарушений комплементарности комплементарной части, как правило, имеют более высокую эффективность и более высокую специфичность, чем АОН с такими нарушениями комплементарности в одной или нескольких областях комплементарности. Считается, что более

высокие силы гибридизации (т.е. увеличение числа взаимодействий с противоположной цепью) благоприятны для повышения эффективности вмешательства в аппарат сплайсинга системы.

АОН по изобретению предпочтительно не содержит участка CpG, более предпочтительно, не содержит никаких CpG. Присутствие CpG или фрагмента CpG в олигонуклеотиде, как правило, связано с повышенной иммуногенностью указанного олигонуклеотида (Dorn и KirpЭnberger, 2008). Повышенная иммуногенность нежелательна, поскольку она может вызвать повреждение ткани, которую лечат, т.е. глаза. Иммуногенность можно оценивать на модели на животных путем оценки присутствия клеток CD4+ и/или CD8+ и/или воспалительной инфильтрации мононуклеарами. Иммуногенность можно также оценивать в крови животного или человека, которого лечат АОН по изобретению, выявляя присутствие нейтрализующего антитела и/или антитела, распознающего указанный АОН, при помощи стандартного иммунологического анализа, известного специалисту. Воспалительную реакцию, выработку интерферона типа I, выработку IL-12 и/или повышение иммуногенности можно оценивать, выявляя наличие или повышенное количество нейтрализующего антитела или антитела, распознающего указанный АОН, при помощи стандартного иммунологического анализа. АОН по изобретению еще более предпочтительно имеет приемлемую кинетику связывания с РНК и/или термодинамические свойства. Кинетика связывания с РНК и/или термодинамические свойства, по меньшей мере, частично определяются температурой плавления олигонуклеотида ( $T_m$ ; рассчитывается при помощи калькулятора свойств олигонуклеотида ([www.unc.edu/~cail/biotool/oligo/index](http://www.unc.edu/~cail/biotool/oligo/index)) для одноцепочечной РНК с использованием базовой  $T_m$  и модели ближайшего соседа), и/или свободной энергией комплекса АОН-целевой экзон (при помощи RNA structure, версии 4.5). Если  $T_m$  слишком высокая, ожидается, что АОН будет менее специфичным. Приемлемая  $T_m$  и свободная энергия зависят от последовательности АОН. Таким образом, сложно получить предпочтительные диапазоны для каждого из этих параметров. Приемлемая  $T_m$  может находиться в диапазоне между 35 и 70°C, а приемлемая свободная энергия может находиться в

диапазоне между 15 и 45 кКал/моль. Специалист, таким образом, может сначала выбрать АОН в качестве потенциального терапевтического соединения, который связывается и/или комплементарен SEQ ID NO: 10, 161, 30, 81, 101, 121, 141 или SEQ ID NO: 261, или их частям, как определено далее в настоящем документе. Специалист может проверить, что указанный АОН способен связываться с указанными последовательностями, как ранее определено в настоящем документе. Необязательно на втором этапе, он может использовать изобретение для дополнительной оптимизации указанного АОН, проверяя его на отсутствие CpG и/или оптимизируя его Tm и/или свободную энергию комплекса АОН-мишень. Он может пытаться сконструировать АОН с несколькими CpG, предпочтительно, с отсутствием CpG и/или с более приемлемой Tm и/или свободной энергией, получая его путем выбора определенной последовательности ABCA4 (включая SEQ ID NO: 10, 161, 30, 81, 101, 121, 141 и SEQ ID NO: 261, или их части), которой комплементарен АОН. Альтернативно, если АОН комплементарен указанному фрагменту в пределах SEQ ID NO: 10 или 30, содержит CpG, и/или не имеет приемлемой Tm и/или свободной энергии, специалист может улучшить любые из этих параметров, уменьшая длину АОН, и/или выбирая определенный фрагмент в SEQ ID NO: 10, 161, 30, 81, 101, 121, 141 или SEQ ID NO: 261, которому комплементарен АОН, и/или изменяя химию АОН.

Считается, что АОН по изобретению индуцирует пропуск экзона, если процент пропуска при измерении количественной ОТ-ПЦР в реальном времени составляет, по меньшей мере, 30%, или, по меньшей мере, 35%, или, по меньшей мере, 40%, или, по меньшей мере, 45%, или, по меньшей мере, 50%, или, по меньшей мере, 55%, или, по меньшей мере, 60%, или, по меньшей мере, 65%, или, по меньшей мере, 70%, или, по меньшей мере, 75%, или, по меньшей мере, 80%, или, по меньшей мере, 85%, или, по меньшей мере, 90%, или, по меньшей мере, 95%, или 100%.

Считается, что АОН по изобретению индуцирует сохранение экзона, если процент сохранения при измерении количественной ОТ-ПЦР в реальном времени составляет, по меньшей мере, 30%, или, по меньшей мере, 35%, или, по меньшей мере, 40%, или, по меньшей мере



мере, 45%, или, по меньшей мере, 50%, или, по меньшей мере, 55%, или, по меньшей мере, 60%, или, по меньшей мере, 65%, или, по меньшей мере, 70%, или, по меньшей мере, 75%, или, по меньшей мере, 80%, или, по меньшей мере, 85%, или, по меньшей мере, 90%, или, по меньшей мере, 95%, или 100%.

Предпочтительно, АОН по изобретению, содержащий часть, которая (по существу) комплементарна SEQ ID NO: 10, 161, 30, 81, 101, 121, 141 или SEQ ID NO: 261, или их части, представляет собой АОН, где (по существу) комплементарная часть составляет, по меньшей мере, 50% длины АОН по изобретению, более предпочтительно, по меньшей мере, 60%, даже более предпочтительно, по меньшей мере, 70%, даже более предпочтительно, по меньшей мере, 80%, даже более предпочтительно, по меньшей мере, 90% или даже более предпочтительно, по меньшей мере, 95%, или даже более предпочтительно 98% или даже более предпочтительно, по меньшей мере, 99%, или даже более предпочтительно 100%. Предпочтительно, АОН по изобретению содержит или включает последовательность, которая комплементарна или по существу комплементарна части SEQ ID NO: 10 или 30. В качестве примера, АОН может содержать последовательность, которая комплементарна или по существу комплементарна части SEQ ID NO: 10 или 30 и содержит дополнительные фланкирующие последовательности.

Предпочтительно, АОН по изобретению представляет собой АОН, где часть, которая (по существу) комплементарна полинуклеотиду с нуклеотидной последовательностью, состоящей из SEQ ID NO: 10 или SEQ ID NO: 30, или их части, содержит, по меньшей мере, один мотив ESE (экзонный энхансер сплайсинга), предпочтительно два, три, четыре или более мотивов ESE. Мотивы ESE известны специалисту в данной области. Выявление и определение ESE предпочтительно проводят так же, как и в примерах в настоящем документе. В варианте осуществления, АОН по изобретению не содержит мотив ESE.

Предпочтительно, АОН по изобретению представляет собой АОН, где часть, которая (по существу) комплементарна полинуклеотиду с нуклеотидной последовательностью, состоящей из SEQ ID NO: 10,

161, 30, 81, 101, 121, 141 или SEQ ID NO: 261, или их части, имеет длину приблизительно от 8 до приблизительно 40 нуклеотидов, а именно, предпочтительно приблизительно от 10 до приблизительно 40 нуклеотидов, более предпочтительно приблизительно от 14 до приблизительно 30 нуклеотидов, более предпочтительно приблизительно от 16 до приблизительно 24 нуклеотидов, а именно, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 или 24 нуклеотида. Предпочтительно, АОН по изобретению представляет собой АОН, где часть, которая (по существу) комплементарна полинуклеотиду с нуклеотидной последовательностью, состоящей из SEQ ID NO: 10, 161, 30, 81, 101, 121, 141 или SEQ ID NO: 261, или их части, имеет длину от 8 до 40 нуклеотиды, а именно, предпочтительно от 10 до 40 нуклеотидов, более предпочтительно от 14 до 30 нуклеотидов, более предпочтительно от 16 до 24 нуклеотидов, а именно, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 или 24 нуклеотида. Предпочтительно, АОН по изобретению представляет собой АОН, где часть, которая (по существу) комплементарна полинуклеотиду с нуклеотидной последовательностью, состоящей из SEQ ID NO: 10, 161, 30, 81, 101, 121, 141 или SEQ ID NO: 261, или их части, 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, и указанная часть, которая (по существу) комплементарна полинуклеотиду с нуклеотидной последовательностью, состоящей из SEQ ID NO: 10, 161, 30, 81, 101, 121, 141 или SEQ ID NO: 261, или их части, имеет длину не более 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.

Дополнительные последовательности (по существу) комплементарной части можно использовать для модификации связывания белка, такого как фактор, способствующий сплайсингу, с АОН, или для модификации термодинамического свойства АОН, а именно, для модификации аффинности связывания с целевой РНК.

Предпочтительный АОН по изобретению для перенаправления сплайсинга имеет длину приблизительно от 8 до приблизительно 100

нуклеотидов, предпочтительно приблизительно от 10 до приблизительно 40 нуклеотидов, более предпочтительно приблизительно от 14 до приблизительно 30 нуклеотидов, более предпочтительно приблизительно от 16 до 24 нуклеотидов, такую как 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 или 24 нуклеотидов. Более предпочтительный АОН по изобретению для перенаправления сплайсинга имеет длину от 8 до 100 нуклеотидов, предпочтительно от 10 до 40 нуклеотидов, более предпочтительно от 14 до 30 нуклеотидов, более предпочтительно от 16 до 24 нуклеотидов, а именно, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 или 24 нуклеотидов. Предпочтительно, АОН по 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. Предпочтительно, АОН по изобретению имеет длину не более чем 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, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100 нуклеотидов.

В варианте осуществления предлагается АОН, который содержит или включает последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 15, 18, 21, 165, 168, 171, 35, 38, 41, 44, 184, 187, 190, 193, 196, 199, 202, 205, 208, 211, 214, 217, 220, 223, 226, 229, 232, 235, 238, 241, 244, 247, 250, 253, 256, 259, 85, 88, 91, 105, 108, 111, 125, 128, 131, 145, 148, 151, 265, 268 и SEQ ID NO: 271.

В предпочтительном варианте осуществления предлагается АОН, который содержит или включает последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 15. Предпочтительный АОН, включающий SEQ ID NO: 15, предпочтительно содержит приблизительно от 8 до приблизительно 100 нуклеотидов, предпочтительно приблизительно от 10 до приблизительно 40 нуклеотидов, более предпочтительно приблизительно от 14 до приблизительно 30 нуклеотидов, более предпочтительно

приблизительно от 16 до приблизительно 24 нуклеотидов, а именно, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 или 24 нуклеотидов, или предпочтительно содержит или включает 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, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100 нуклеотидов.

В предпочтительном варианте осуществления предлагается АОН, который содержит или включает последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 18. Предпочтительный АОН, включающий SEQ ID NO: 18, предпочтительно содержит приблизительно от 8 до приблизительно 100 нуклеотидов, предпочтительно приблизительно от 10 до приблизительно 40 нуклеотидов, более предпочтительно приблизительно от 14 до приблизительно 30 нуклеотидов, более предпочтительно приблизительно от 16 до приблизительно 24 нуклеотидов, а именно, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 или 24 нуклеотидов, или предпочтительно содержит или включает 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, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100 нуклеотидов.

В предпочтительном варианте осуществления предлагается АОН, который содержит или включает последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 21. Предпочтительный АОН, включающий SEQ ID NO: 21, предпочтительно содержит приблизительно от 8 до приблизительно 100 нуклеотидов, предпочтительно приблизительно от 10 до приблизительно 40 нуклеотидов, более предпочтительно приблизительно от 14 до приблизительно 30 нуклеотидов, более предпочтительно приблизительно от 16 до приблизительно 24 нуклеотидов, а именно, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 или 24 нуклеотидов, или

предпочтительно содержит или включает 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, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100 нуклеотидов.

В предпочтительном варианте осуществления предлагается АОН, который содержит или включает последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 35. Предпочтительный АОН, включающий SEQ ID NO: 35, предпочтительно содержит приблизительно от 8 до приблизительно 100 нуклеотидов, предпочтительно приблизительно от 10 до приблизительно 40 нуклеотидов, более предпочтительно приблизительно от 14 до приблизительно 30 нуклеотидов, более предпочтительно приблизительно от 16 до приблизительно 24 нуклеотидов, а именно, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 или 24 нуклеотидов, или предпочтительно содержит или включает 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, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100 нуклеотидов.

В предпочтительном варианте осуществления предлагается АОН, который содержит или включает последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 38. Предпочтительный АОН, включающий SEQ ID NO: 38, предпочтительно содержит приблизительно от 8 до приблизительно 100 нуклеотидов, предпочтительно приблизительно от 10 до приблизительно 40 нуклеотидов, более предпочтительно приблизительно от 14 до приблизительно 30 нуклеотидов, более предпочтительно приблизительно от 16 до приблизительно 24 нуклеотидов, а именно, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 или 24 нуклеотидов, или предпочтительно содержит или включает 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, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100 нуклеотидов.

В предпочтительном варианте осуществления предлагается АОН, который содержит или включает последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 41. Предпочтительный АОН, включающий SEQ ID NO: 41, предпочтительно содержит приблизительно от 8 до приблизительно 100 нуклеотидов, предпочтительно приблизительно от 10 до приблизительно 40 нуклеотидов, более предпочтительно приблизительно от 14 до приблизительно 30 нуклеотидов, более предпочтительно приблизительно от 16 до приблизительно 24 нуклеотидов, а именно, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 или 24 нуклеотидов, или предпочтительно содержит или включает 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, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100 нуклеотидов.

В предпочтительном варианте осуществления предлагается АОН, который содержит или включает последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 44. Предпочтительный АОН, включающий SEQ ID NO: 44, предпочтительно содержит приблизительно от 8 до приблизительно 100 нуклеотидов, предпочтительно приблизительно от 10 до приблизительно 40 нуклеотидов, более предпочтительно приблизительно от 14 до приблизительно 30 нуклеотидов, более предпочтительно приблизительно от 16 до приблизительно 24 нуклеотидов, а именно, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 или 24 нуклеотидов, или предпочтительно содержит или включает 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, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64,

65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100 нуклеотидов.

В предпочтительном варианте осуществления предлагается АОН, который содержит или включает последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 165. Предпочтительный АОН, включающий SEQ ID NO: 165, предпочтительно содержит приблизительно от 8 до приблизительно 100 нуклеотидов, предпочтительно приблизительно от 10 до приблизительно 40 нуклеотидов, более предпочтительно приблизительно от 14 до приблизительно 30 нуклеотидов, более предпочтительно приблизительно от 16 до приблизительно 24 нуклеотидов, а именно, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 или 24 нуклеотидов, или предпочтительно содержит или включает 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, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100 нуклеотидов.

В предпочтительном варианте осуществления предлагается АОН, который содержит или включает последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 168. Предпочтительный АОН, включающий SEQ ID NO: 168, предпочтительно содержит приблизительно от 8 до приблизительно 100 нуклеотидов, предпочтительно приблизительно от 10 до приблизительно 40 нуклеотидов, более предпочтительно приблизительно от 14 до приблизительно 30 нуклеотидов, более предпочтительно приблизительно от 16 до приблизительно 24 нуклеотидов, а именно, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 или 24 нуклеотидов, или предпочтительно содержит или включает 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, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96,

97, 98, 99 или 100 нуклеотидов.

В предпочтительном варианте осуществления предлагается АОН, который содержит или включает последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 171. Предпочтительный АОН, включающий SEQ ID NO: 171, предпочтительно содержит приблизительно от 8 до приблизительно 100 нуклеотидов, предпочтительно приблизительно от 10 до приблизительно 40 нуклеотидов, более предпочтительно приблизительно от 14 до приблизительно 30 нуклеотидов, более предпочтительно приблизительно от 16 до приблизительно 24 нуклеотидов, а именно, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 или 24 нуклеотидов, или предпочтительно содержит или включает 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, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100 нуклеотидов.

В предпочтительном варианте осуществления предлагается АОН, который содержит или включает последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 184. Предпочтительный АОН, включающий SEQ ID NO: 184, предпочтительно содержит приблизительно от 8 до приблизительно 100 нуклеотидов, предпочтительно приблизительно от 10 до приблизительно 40 нуклеотидов, более предпочтительно приблизительно от 14 до приблизительно 30 нуклеотидов, более предпочтительно приблизительно от 16 до приблизительно 24 нуклеотидов, а именно, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 или 24 нуклеотидов, или предпочтительно содержит или включает 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, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100 нуклеотидов.

В предпочтительном варианте осуществления предлагается АОН,



который содержит или включает последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 187. Предпочтительный АОН, включающий SEQ ID NO: 187, предпочтительно содержит приблизительно от 8 до приблизительно 100 нуклеотидов, предпочтительно приблизительно от 10 до приблизительно 40 нуклеотидов, более предпочтительно приблизительно от 14 до приблизительно 30 нуклеотидов, более предпочтительно приблизительно от 16 до приблизительно 24 нуклеотидов, а именно, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 или 24 нуклеотидов, или предпочтительно содержит или включает 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, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100 нуклеотидов.

В предпочтительном варианте осуществления предлагается АОН, который содержит или включает последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 190. Предпочтительный АОН, включающий SEQ ID NO: 190, предпочтительно содержит приблизительно от 8 до приблизительно 100 нуклеотидов, предпочтительно приблизительно от 10 до приблизительно 40 нуклеотидов, более предпочтительно приблизительно от 14 до приблизительно 30 нуклеотидов, более предпочтительно приблизительно от 16 до приблизительно 24 нуклеотидов, а именно, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 или 24 нуклеотидов, или предпочтительно содержит или включает 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, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100 нуклеотидов.

В предпочтительном варианте осуществления предлагается АОН, который содержит или включает последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 193. Предпочтительный АОН,

включающий SEQ ID NO: 193, предпочтительно содержит приблизительно от 8 до приблизительно 100 нуклеотидов, предпочтительно приблизительно от 10 до приблизительно 40 нуклеотидов, более предпочтительно приблизительно от 14 до приблизительно 30 нуклеотидов, более предпочтительно приблизительно от 16 до приблизительно 24 нуклеотидов, а именно, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 или 24 нуклеотидов, или предпочтительно содержит или включает 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, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100 нуклеотидов.

В предпочтительном варианте осуществления предлагается АОН, который содержит или включает последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 196. Предпочтительный АОН, включающий SEQ ID NO: 196, предпочтительно содержит приблизительно от 8 до приблизительно 100 нуклеотидов, предпочтительно приблизительно от 10 до приблизительно 40 нуклеотидов, более предпочтительно приблизительно от 14 до приблизительно 30 нуклеотидов, более предпочтительно приблизительно от 16 до приблизительно 24 нуклеотидов, а именно, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 или 24 нуклеотидов, или предпочтительно содержит или включает 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, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100 нуклеотидов.

В предпочтительном варианте осуществления предлагается АОН, который содержит или включает последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 199. Предпочтительный АОН, включающий SEQ ID NO: 199, предпочтительно содержит приблизительно от 8 до приблизительно 100 нуклеотидов,

предпочтительно приблизительно от 10 до приблизительно 40 нуклеотидов, более предпочтительно приблизительно от 14 до приблизительно 30 нуклеотидов, более предпочтительно приблизительно от 16 до приблизительно 24 нуклеотидов, а именно, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 или 24 нуклеотидов, или предпочтительно содержит или включает 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, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100 нуклеотидов<sup>88</sup>, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, или 100 нуклеотиды.

В предпочтительном варианте осуществления предлагается АОН, который содержит или включает последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 202. Предпочтительный АОН, включающий SEQ ID NO: 202, предпочтительно содержит приблизительно от 8 до приблизительно 100 нуклеотидов, предпочтительно приблизительно от 10 до приблизительно 40 нуклеотидов, более предпочтительно приблизительно от 14 до приблизительно 30 нуклеотидов, более предпочтительно приблизительно от 16 до приблизительно 24 нуклеотидов, а именно, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 или 24 нуклеотидов, или предпочтительно содержит или включает 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, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100 нуклеотидов.

В предпочтительном варианте осуществления предлагается АОН, который содержит или включает последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 205. Предпочтительный АОН, включающий SEQ ID NO: 205, предпочтительно содержит приблизительно от 8 до приблизительно 100 нуклеотидов, предпочтительно приблизительно от 10 до приблизительно 40

нуклеотидов, более предпочтительно приблизительно от 14 до приблизительно 30 нуклеотидов, более предпочтительно приблизительно от 16 до приблизительно 24 нуклеотидов, а именно, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 или 24 нуклеотидов, или предпочтительно содержит или включает 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, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100 нуклеотидов.

В предпочтительном варианте осуществления предлагается АОН, который содержит или включает последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 208. Предпочтительный АОН, включающий SEQ ID NO: 208, предпочтительно содержит приблизительно от 8 до приблизительно 100 нуклеотидов, предпочтительно приблизительно от 10 до приблизительно 40 нуклеотидов, более предпочтительно приблизительно от 14 до приблизительно 30 нуклеотидов, более предпочтительно приблизительно от 16 до приблизительно 24 нуклеотидов, а именно, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 или 24 нуклеотидов, или предпочтительно содержит или включает 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, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100 нуклеотидов.

В предпочтительном варианте осуществления предлагается АОН, который содержит или включает последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 211. Предпочтительный АОН, включающий SEQ ID NO: 211, предпочтительно содержит приблизительно от 8 до приблизительно 100 нуклеотидов, предпочтительно приблизительно от 10 до приблизительно 40 нуклеотидов, более предпочтительно приблизительно от 14 до приблизительно 30 нуклеотидов, более предпочтительно

приблизительно от 16 до приблизительно 24 нуклеотидов, а именно, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 или 24 нуклеотидов, или предпочтительно содержит или включает 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, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100 нуклеотидов.

В предпочтительном варианте осуществления предлагается АОН, который содержит или включает последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 214. Предпочтительный АОН, включающий SEQ ID NO: 214, предпочтительно содержит приблизительно от 8 до приблизительно 100 нуклеотидов, предпочтительно приблизительно от 10 до приблизительно 40 нуклеотидов, более предпочтительно приблизительно от 14 до приблизительно 30 нуклеотидов, более предпочтительно приблизительно от 16 до приблизительно 24 нуклеотидов, а именно, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 или 24 нуклеотидов, или предпочтительно содержит или включает 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, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100 нуклеотидов.

В предпочтительном варианте осуществления предлагается АОН, который содержит или включает последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 217. Предпочтительный АОН, включающий SEQ ID NO: 217, предпочтительно содержит приблизительно от 8 до приблизительно 100 нуклеотидов, предпочтительно приблизительно от 10 до приблизительно 40 нуклеотидов, более предпочтительно приблизительно от 14 до приблизительно 30 нуклеотидов, более предпочтительно приблизительно от 16 до приблизительно 24 нуклеотидов, а именно, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 или 24 нуклеотидов, или

предпочтительно содержит или включает 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, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100 нуклеотидов 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, или 100 нуклеотиды.

В предпочтительном варианте осуществления предлагается АОН, который содержит или включает последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 220. Предпочтительный АОН, включающий SEQ ID NO: 220, предпочтительно содержит приблизительно от 8 до приблизительно 100 нуклеотидов, предпочтительно приблизительно от 10 до приблизительно 40 нуклеотидов, более предпочтительно приблизительно от 14 до приблизительно 30 нуклеотидов, более предпочтительно приблизительно от 16 до приблизительно 24 нуклеотидов, а именно, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 или 24 нуклеотидов, или предпочтительно содержит или включает 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, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100 нуклеотидов.

В предпочтительном варианте осуществления предлагается АОН, который содержит или включает последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 223. Предпочтительный АОН, включающий SEQ ID NO: 223, предпочтительно содержит приблизительно от 8 до приблизительно 100 нуклеотидов, предпочтительно приблизительно от 10 до приблизительно 40 нуклеотидов, более предпочтительно приблизительно от 14 до приблизительно 30 нуклеотидов, более предпочтительно приблизительно от 16 до приблизительно 24 нуклеотидов, а именно, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 или 24 нуклеотидов, или предпочтительно содержит или включает 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, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100 нуклеотидов.

В предпочтительном варианте осуществления предлагается АОН, который содержит или включает последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 226. Предпочтительный АОН, включающий SEQ ID NO: 226, предпочтительно содержит приблизительно от 8 до приблизительно 100 нуклеотидов, предпочтительно приблизительно от 10 до приблизительно 40 нуклеотидов, более предпочтительно приблизительно от 14 до приблизительно 30 нуклеотидов, более предпочтительно приблизительно от 16 до приблизительно 24 нуклеотидов, а именно, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 или 24 нуклеотидов, или предпочтительно содержит или включает 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, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100 нуклеотидов.

В предпочтительном варианте осуществления предлагается АОН, который содержит или включает последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 229. Предпочтительный АОН, включающий SEQ ID NO: 229, предпочтительно содержит приблизительно от 8 до приблизительно 100 нуклеотидов, предпочтительно приблизительно от 10 до приблизительно 40 нуклеотидов, более предпочтительно приблизительно от 14 до приблизительно 30 нуклеотидов, более предпочтительно приблизительно от 16 до приблизительно 24 нуклеотидов, а именно, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 или 24 нуклеотидов, или предпочтительно содержит или включает 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, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48,

49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100 нуклеотидов.

В предпочтительном варианте осуществления предлагается АОН, который содержит или включает последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 232. Предпочтительный АОН, включающий SEQ ID NO: 232, предпочтительно содержит приблизительно от 8 до приблизительно 100 нуклеотидов, предпочтительно приблизительно от 10 до приблизительно 40 нуклеотидов, более предпочтительно приблизительно от 14 до приблизительно 30 нуклеотидов, более предпочтительно приблизительно от 16 до приблизительно 24 нуклеотидов, а именно, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 или 24 нуклеотидов, или предпочтительно содержит или включает 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, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100 нуклеотидов.

В предпочтительном варианте осуществления предлагается АОН, который содержит или включает последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 235. Предпочтительный АОН, включающий SEQ ID NO: 235, предпочтительно содержит приблизительно от 8 до приблизительно 100 нуклеотидов, предпочтительно приблизительно от 10 до приблизительно 40 нуклеотидов, более предпочтительно приблизительно от 14 до приблизительно 30 нуклеотидов, более предпочтительно приблизительно от 16 до приблизительно 24 нуклеотидов, а именно, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 или 24 нуклеотидов, или предпочтительно содержит или включает 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, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80,



81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100 нуклеотидов, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, или 100 нуклеотиды.

В предпочтительном варианте осуществления предлагается АОН, который содержит или включает последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 238. Предпочтительный АОН, включающий SEQ ID NO: 238, предпочтительно содержит приблизительно от 8 до приблизительно 100 нуклеотидов, предпочтительно приблизительно от 10 до приблизительно 40 нуклеотидов, более предпочтительно приблизительно от 14 до приблизительно 30 нуклеотидов, более предпочтительно приблизительно от 16 до приблизительно 24 нуклеотидов, а именно, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 или 24 нуклеотидов, или предпочтительно содержит или включает 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, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100 нуклеотидов.

В предпочтительном варианте осуществления предлагается АОН, который содержит или включает последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 241. Предпочтительный АОН, включающий SEQ ID NO: 241, предпочтительно содержит приблизительно от 8 до приблизительно 100 нуклеотидов, предпочтительно приблизительно от 10 до приблизительно 40 нуклеотидов, более предпочтительно приблизительно от 14 до приблизительно 30 нуклеотидов, более предпочтительно приблизительно от 16 до приблизительно 24 нуклеотидов, а именно, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 или 24 нуклеотидов, или предпочтительно содержит или включает 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, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96,

97, 98, 99 или 100 нуклеотидов.

В предпочтительном варианте осуществления предлагается АОН, который содержит или включает последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 244. Предпочтительный АОН, включающий SEQ ID NO: 244, предпочтительно содержит приблизительно от 8 до приблизительно 100 нуклеотидов, предпочтительно приблизительно от 10 до приблизительно 40 нуклеотидов, более предпочтительно приблизительно от 14 до приблизительно 30 нуклеотидов, более предпочтительно приблизительно от 16 до приблизительно 24 нуклеотидов, а именно, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 или 24 нуклеотидов, или предпочтительно содержит или включает 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, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100 нуклеотидов.

В предпочтительном варианте осуществления предлагается АОН, который содержит или включает последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 247. Предпочтительный АОН, включающий SEQ ID NO: 247, предпочтительно содержит приблизительно от 8 до приблизительно 100 нуклеотидов, предпочтительно приблизительно от 10 до приблизительно 40 нуклеотидов, более предпочтительно приблизительно от 14 до приблизительно 30 нуклеотидов, более предпочтительно приблизительно от 16 до приблизительно 24 нуклеотидов, а именно, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 или 24 нуклеотидов, или предпочтительно содержит или включает 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, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100 нуклеотидов.

В предпочтительном варианте осуществления предлагается АОН,

который содержит или включает последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 250. Предпочтительный АОН, включающий SEQ ID NO: 250, предпочтительно содержит приблизительно от 8 до приблизительно 100 нуклеотидов, предпочтительно приблизительно от 10 до приблизительно 40 нуклеотидов, более предпочтительно приблизительно от 14 до приблизительно 30 нуклеотидов, более предпочтительно приблизительно от 16 до приблизительно 24 нуклеотидов, а именно, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 или 24 нуклеотидов, или предпочтительно содержит или включает 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, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100 нуклеотидов.

В предпочтительном варианте осуществления предлагается АОН, который содержит или включает последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 253. Предпочтительный АОН, включающий SEQ ID NO: 253, предпочтительно содержит приблизительно от 8 до приблизительно 100 нуклеотидов, предпочтительно приблизительно от 10 до приблизительно 40 нуклеотидов, более предпочтительно приблизительно от 14 до приблизительно 30 нуклеотидов, более предпочтительно приблизительно от 16 до приблизительно 24 нуклеотидов, а именно, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 или 24 нуклеотидов, или предпочтительно содержит или включает 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, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100 нуклеотидов.

В предпочтительном варианте осуществления предлагается АОН, который содержит или включает последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 256. Предпочтительный АОН,

включающий SEQ ID NO: 256, предпочтительно содержит приблизительно от 8 до приблизительно 100 нуклеотидов, предпочтительно приблизительно от 10 до приблизительно 40 нуклеотидов, более предпочтительно приблизительно от 14 до приблизительно 30 нуклеотидов, более предпочтительно приблизительно от 16 до приблизительно 24 нуклеотидов, а именно, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 или 24 нуклеотидов, или предпочтительно содержит или включает 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, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100 нуклеотидов.

В предпочтительном варианте осуществления предлагается АОН, который содержит или включает последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 259. Предпочтительный АОН, включающий SEQ ID NO: 259, предпочтительно содержит приблизительно от 8 до приблизительно 100 нуклеотидов, предпочтительно приблизительно от 10 до приблизительно 40 нуклеотидов, более предпочтительно приблизительно от 14 до приблизительно 30 нуклеотидов, более предпочтительно приблизительно от 16 до приблизительно 24 нуклеотидов, а именно, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 или 24 нуклеотидов, или предпочтительно содержит или включает 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, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100 нуклеотидов.

В предпочтительном варианте осуществления предлагается АОН, который содержит или включает последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 85. Предпочтительный АОН, включающий SEQ ID NO: 85, предпочтительно содержит приблизительно от 8 до приблизительно 100 нуклеотидов,

предпочтительно приблизительно от 10 до приблизительно 40 нуклеотидов, более предпочтительно приблизительно от 14 до приблизительно 30 нуклеотидов, более предпочтительно приблизительно от 16 до приблизительно 24 нуклеотидов, а именно, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 или 24 нуклеотидов, или предпочтительно содержит или включает 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, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100 нуклеотидов.

В предпочтительном варианте осуществления предлагается АОН, который содержит или включает последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 88. Предпочтительный АОН, включающий SEQ ID NO: 88, предпочтительно содержит приблизительно от 8 до приблизительно 100 нуклеотидов, предпочтительно приблизительно от 10 до приблизительно 40 нуклеотидов, более предпочтительно приблизительно от 14 до приблизительно 30 нуклеотидов, более предпочтительно приблизительно от 16 до приблизительно 24 нуклеотидов, а именно, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 или 24 нуклеотидов, или предпочтительно содержит или включает 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, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100 нуклеотидов.

В предпочтительном варианте осуществления предлагается АОН, который содержит или включает последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 91. Предпочтительный АОН, включающий SEQ ID NO: 91, предпочтительно содержит приблизительно от 8 до приблизительно 100 нуклеотидов, предпочтительно приблизительно от 10 до приблизительно 40 нуклеотидов, более предпочтительно приблизительно от 14 до

приблизительно 30 нуклеотидов, более предпочтительно приблизительно от 16 до приблизительно 24 нуклеотидов, а именно, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 или 24 нуклеотидов, или предпочтительно содержит или включает 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, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100 нуклеотидов.

В предпочтительном варианте осуществления предлагается АОН, который содержит или включает последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 105. Предпочтительный АОН, включающий SEQ ID NO: 105, предпочтительно содержит приблизительно от 8 до приблизительно 100 нуклеотидов, предпочтительно приблизительно от 10 до приблизительно 40 нуклеотидов, более предпочтительно приблизительно от 14 до приблизительно 30 нуклеотидов, более предпочтительно приблизительно от 16 до приблизительно 24 нуклеотидов, а именно, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 или 24 нуклеотидов, или предпочтительно содержит или включает 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, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100 нуклеотидов.

В предпочтительном варианте осуществления предлагается АОН, который содержит или включает последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 108. Предпочтительный АОН, включающий SEQ ID NO: 108, предпочтительно содержит приблизительно от 8 до приблизительно 100 нуклеотидов, предпочтительно приблизительно от 10 до приблизительно 40 нуклеотидов, более предпочтительно приблизительно от 14 до приблизительно 30 нуклеотидов, более предпочтительно приблизительно от 16 до приблизительно 24 нуклеотидов, а именно,

16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 или 24 нуклеотидов, или предпочтительно содержит или включает 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, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100 нуклеотидов.

В предпочтительном варианте осуществления предлагается АОН, который содержит или включает последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 111. Предпочтительный АОН, включающий SEQ ID NO: 111, предпочтительно содержит приблизительно от 8 до приблизительно 100 нуклеотидов, предпочтительно приблизительно от 10 до приблизительно 40 нуклеотидов, более предпочтительно приблизительно от 14 до приблизительно 30 нуклеотидов, более предпочтительно приблизительно от 16 до приблизительно 24 нуклеотидов, а именно, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 или 24 нуклеотидов, или предпочтительно содержит или включает 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, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100 нуклеотидов.

В предпочтительном варианте осуществления предлагается АОН, который содержит или включает последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 125. Предпочтительный АОН, включающий SEQ ID NO: 125, предпочтительно содержит приблизительно от 8 до приблизительно 100 нуклеотидов, предпочтительно приблизительно от 10 до приблизительно 40 нуклеотидов, более предпочтительно приблизительно от 14 до приблизительно 30 нуклеотидов, более предпочтительно приблизительно от 16 до приблизительно 24 нуклеотидов, а именно, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 или 24 нуклеотидов, или предпочтительно содержит или включает 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, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100 нуклеотидов.

В предпочтительном варианте осуществления предлагается АОН, который содержит или включает последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 128. Предпочтительный АОН, включающий SEQ ID NO: 128, предпочтительно содержит приблизительно от 8 до приблизительно 100 нуклеотидов, предпочтительно приблизительно от 10 до приблизительно 40 нуклеотидов, более предпочтительно приблизительно от 14 до приблизительно 30 нуклеотидов, более предпочтительно приблизительно от 16 до приблизительно 24 нуклеотидов, а именно, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 или 24 нуклеотидов, или предпочтительно содержит или включает 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, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100 нуклеотидов, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, или 100 нуклеотиды.

В предпочтительном варианте осуществления предлагается АОН, который содержит или включает последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 131. Предпочтительный АОН, включающий SEQ ID NO: 131, предпочтительно содержит приблизительно от 8 до приблизительно 100 нуклеотидов, предпочтительно приблизительно от 10 до приблизительно 40 нуклеотидов, более предпочтительно приблизительно от 14 до приблизительно 30 нуклеотидов, более предпочтительно приблизительно от 16 до приблизительно 24 нуклеотидов, а именно, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 или 24 нуклеотидов, или предпочтительно содержит или включает 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, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100 нуклеотидов.

В предпочтительном варианте осуществления предлагается АОН, который содержит или включает последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 145. Предпочтительный АОН, включающий SEQ ID NO: 145, предпочтительно содержит приблизительно от 8 до приблизительно 100 нуклеотидов, предпочтительно приблизительно от 10 до приблизительно 40 нуклеотидов, более предпочтительно приблизительно от 14 до приблизительно 30 нуклеотидов, более предпочтительно приблизительно от 16 до приблизительно 24 нуклеотидов, а именно, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 или 24 нуклеотидов, или предпочтительно содержит или включает 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, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100 нуклеотидов.

В предпочтительном варианте осуществления предлагается АОН, который содержит или включает последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 148. Предпочтительный АОН, включающий SEQ ID NO: 148, предпочтительно содержит приблизительно от 8 до приблизительно 100 нуклеотидов, предпочтительно приблизительно от 10 до приблизительно 40 нуклеотидов, более предпочтительно приблизительно от 14 до приблизительно 30 нуклеотидов, более предпочтительно приблизительно от 16 до приблизительно 24 нуклеотидов, а именно, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 или 24 нуклеотидов, или предпочтительно содержит или включает 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, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64,

65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100 нуклеотидов.

В предпочтительном варианте осуществления предлагается АОН, который содержит или включает последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 151. Предпочтительный АОН, включающий SEQ ID NO: 151, предпочтительно содержит приблизительно от 8 до приблизительно 100 нуклеотидов, предпочтительно приблизительно от 10 до приблизительно 40 нуклеотидов, более предпочтительно приблизительно от 14 до приблизительно 30 нуклеотидов, более предпочтительно приблизительно от 16 до приблизительно 24 нуклеотидов, а именно, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 или 24 нуклеотидов, или предпочтительно содержит или включает 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, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100 нуклеотидов.

В предпочтительном варианте осуществления предлагается АОН, который содержит или включает последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 265. Предпочтительный АОН, включающий SEQ ID NO: 265, предпочтительно содержит приблизительно от 8 до приблизительно 100 нуклеотидов, предпочтительно приблизительно от 10 до приблизительно 40 нуклеотидов, более предпочтительно приблизительно от 14 до приблизительно 30 нуклеотидов, более предпочтительно приблизительно от 16 до приблизительно 24 нуклеотидов, а именно, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 или 24 нуклеотидов, или предпочтительно содержит или включает 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, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96,

97, 98, 99 или 100 нуклеотидов.

В предпочтительном варианте осуществления предлагается АОН, который содержит или включает последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 268. Предпочтительный АОН, включающий SEQ ID NO: 268, предпочтительно содержит приблизительно от 8 до приблизительно 100 нуклеотидов, предпочтительно приблизительно от 10 до приблизительно 40 нуклеотидов, более предпочтительно приблизительно от 14 до приблизительно 30 нуклеотидов, более предпочтительно приблизительно от 16 до приблизительно 24 нуклеотидов, а именно, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 или 24 нуклеотидов, или предпочтительно содержит или включает 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, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100 нуклеотидов.

В предпочтительном варианте осуществления предлагается АОН, который содержит или включает последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 271. Предпочтительный АОН, включающий SEQ ID NO: 271, предпочтительно содержит приблизительно от 8 до приблизительно 100 нуклеотидов, предпочтительно приблизительно от 10 до приблизительно 40 нуклеотидов, более предпочтительно приблизительно от 14 до приблизительно 30 нуклеотидов, более предпочтительно приблизительно от 16 до приблизительно 24 нуклеотидов, а именно, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 или 24 нуклеотидов, или предпочтительно содержит или включает 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, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100 нуклеотидов.

АОН по изобретению для перенаправления сплайсинга может

содержать один или несколько остатков РНК (рибонуклеотида), или один или несколько остатков ДНК (дезоксирибонуклеотида), и/или один или несколько аналогов или эквивалентов нуклеотида, как будет подробно описано далее в настоящем документе.

Предпочтительно, чтобы АОН по изобретению для перенаправления сплайсинга содержал один или несколько остатков, которые модифицированы для того чтобы повысить устойчивость к нуклеазам, и/или чтобы увеличить аффинность антисмыслового олигонуклеотида к целевой последовательности. Таким образом, в предпочтительном варианте осуществления АОН содержит, по меньшей мере, один нуклеотидный аналог или эквивалент, где нуклеотидный аналог или эквивалент определяют как остаток с модифицированным основанием, и/или модифицированным остовом, и/или с неприродной межнуклеозидной связью, или с комбинацией этих модификаций.

В предпочтительном варианте осуществления нуклеотидный аналог или эквивалент содержит модифицированный остов. Примеры таких остовов представлены морфолиновыми остовами, карбаматными остовами, силоксановыми остовами, сульфидными, сульфоксидными и сульфоновыми остовами, формацетиловыми и тиоформацетиловыми остовами, метиленаформацетиловыми остовами, рибоацетиловыми остовами, алкен-содержащими остовами, сульфаматными, сульфонатными и сульфонамидными остовами, метилениминовыми и метиленигидразиновыми остовами, и амидными остовами. Фосфородиамидатморфолиновые олигомеры представляют собой олигонуклеотиды с модифицированным остовом, которые ранее были исследованы как антисмысловые агенты.

Морфолиновые олигонуклеотиды имеют незаряженный остов, в котором дезоксирибозный сахар ДНК замещен шестичленным кольцом, а фосфодиэфирная связь замещена фосфоамидатной связью. Морфолиновые олигонуклеотиды устойчивы к ферментативному разрушению и, по-видимому, функционируют как антисмысловые агенты путем ареста трансляции или препятствуя сплайсингу пре-мРНК, а не путем активации РНКазы Н. Морфолиновые олигонуклеотиды успешно доставляли в тканевую культуру клеток при помощи способов, которые физически разрушают клеточную мембрану, и одно исследование, в котором сравнивали эти способы,

выявило, что введение при соскабливании является наиболее эффективным способом доставки; однако, поскольку морфолиновый остов не заряжен, катионные липиды не являются эффективными медиаторами захвата морфолиновых олигонуклеотидов в клетки. Недавняя статья показала формирование триплекса морфолиновым олигонуклеотидом, и, из-за неионного остова, эти исследования показали, что морфолиновый олигонуклеотид был способен формировать триплекс в отсутствие магния.

Еще более предпочтительно, чтобы связь между остатками остова не включала атом фосфора, а именно, связь, которая образована межнуклеозидными связями короткоцепочечного алкила или циклоалкила, межнуклеозидными связями смешанного гетероатома и алкила или циклоалкила, или межнуклеозидными связями одного или нескольких короткоцепочечных гетероатомов или гетероциклов.

Предпочтительный нуклеотидный аналог или эквивалент содержит пептид-нуклеиновую кислоту (ПНК), с модифицированным полиамидным остовом (Nielsen et al., 1991). Молекулы на основе ПНК являются истинными миметиками молекул ДНК в отношении распознавания по парам оснований. Остов ПНК состоит из единиц N-(2-аминоэтил)-глицина, связанных пептидными связями, где нуклеиновые основания связаны с остовом метиленкарбонильными связями. Альтернативный остов содержит одноуглеродный протяженный пирролидиновый мономер ПНК (Govindaraju и Kumar, 2005). Поскольку остов молекулы ПНК не содержит заряженных фосфатных групп, гибриды ПНК-РНК, как правило, более стабильны, чем гибриды РНК-РНК или РНК-ДНК, соответственно (Egholm et al., 1993). Еще более предпочтительный остов содержит морфолиновый нуклеотидный аналог или эквивалент, в котором сахар рибозы или дезоксирибозы замещен шестичленным морфолиновым кольцом. Наиболее предпочтительный нуклеотидный аналог или эквивалент содержит фосфоамидатморфолиновый олигомер (РМО), в котором сахар рибозы или дезоксирибозы замещен шестичленным морфолиновым кольцом, а анионная фосфодиэфирная связь между соседними морфолиновыми кольцами замещена неионной фосфоамидатной связью.

Еще в одном дополнительном варианте осуществления

нуклеотидный аналог или эквивалент по изобретению содержит замену одного не-мостиковых кислородов в фосфодиэфирной связи. Такая модификация слегка дестабилизирует спаривание, но добавляет дополнительную устойчивость к разрушению нуклеазами. Предпочтительный нуклеотидный аналог или эквивалент содержит тиофосфат, хиральный тиофосфат, фосфородитиоат, фосфотриэфир, аминоалкилфосфотриэфир, N-фосфонат, метил и другой алкилфосфонат, включая 3'-алкилен фосфонат, 5'-алкилен фосфонат и хиральный фосфонат, фосфинат, фосфорамидат, включая 3'-амино фосфорамидат и аминоалкилфосфорамидат, тионофосфорамидат, тионоалкилфосфонат, тионоалкилфосфотриэфир, селенофосфат или боранофосфат.

Еще более предпочтительный нуклеотидный аналог или эквивалент по изобретению содержит один или несколько сахарных групп, которые являются моно- или дизамещенными по 2', 3' и/или 5' положению, такие как -ОН; -F; замещенный или незамещенный, линейный или разветвленный низший (C1-C10) алкил, алкенил, алкинил, алкарил, аллил, или аралкил, которые могут прерываться одним или несколькими гетероатомами; O-, S-, или N-алкил; O-, S-, или N-алкенил; O-, S-или N-алкинил; O-, S-, или N- аллил; O-алкил-O-алкил, -метокси, -аминопропокси; метоксиэтокси; диметиламинооксиэтокси; и -диметиламиноэтоксиэтокси. Сахарная группа может быть пиранозой или ее производным, или дезоксипиранозой или ее производным, предпочтительно рибозой или ее производным, или дезоксирибозой или ее производным. Предпочтительно производное сахарной группы содержит замкнутую нуклеиновую кислоту (ЗНК), в которой 2'-атом углерода связан с 3' или 4'-атомом углерода сахарного кольца, таким образом, формируя бициклическую сахарную группу. Предпочтительная ЗНК содержит 2'-O-, 4'-C-этилен-мостиковую нуклеиновую кислоту (Morita et al., 2001). Эти замены придают нуклеотидному аналогу или эквиваленту устойчивость к РНКазе H и нуклеазам и повышают аффинность к РНК-мишени.

В другом варианте осуществления нуклеотидный аналог или эквивалент по изобретению содержит одну или несколько модификаций или замен оснований. Модифицированные основания

включают синтетические и природные основания, такие как инозин, ксантин, гипоксантин и другие аза-, деаза-, -гидрокси-, -гало-, -тио-, тиол-, -алкил-, -алкенил-, -алкинил-, тиаалкил производные пиримидиновых и пуриновых оснований, которые известны или будут известны в данной области.

Специалисту следует понимать, что необязательно все положения в АОН должны быть модифицированы единообразно. Кроме того, в один АОН можно вводить более чем один вышеуказанный аналог или эквивалент или даже в одно положение в АОН. В определенных вариантах осуществления АОН по изобретению имеет, по меньшей мере, два различных типа аналогов или эквивалентов.

Таким образом, предпочтительный АОН по изобретению для перенаправления сплайсинга содержит а 2'-О алкилтиофосфатный антисмысловой олигонуклеотид, такой как 2'-О-метил модифицированная рибоза (РНК), 2'-О-этил модифицированная рибоза, 2'-О-пропил модифицированная рибоза, и/или замещенные производные этих модификаций, такие как галогенированные производные.

Специалисту следует также понимать, что для эффективной терапии можно комбинировать различные АОН по изобретению. В варианте осуществления, применяют комбинацию, по меньшей мере, из двух АОН по изобретению, а именно, двух различных АОН по изобретению, трех различных АОН по изобретению, четырех различных АОН по изобретению, или пяти АОН по изобретению.

АОН по изобретению для перенаправления сплайсинга может быть связан с группой, которая усиливает захват антисмыслового олигонуклеотида в клетки, предпочтительно клетки сетчатки. Примеры таких групп представляют собой холестерин, углеводы, витамины, биотин, липиды, фосфолипиды, пептиды, проникающие в клетки, включая в качестве неограничивающих примеров антеннапедию, ТАТ, транспортан и положительно заряженные аминокислоты, такие как олигоаргинин, полиаргинин, олиголизин или полилизин, антигенсвязывающие домены, представленные антителом, Fab-фрагментом антитела, или одноцепочечным антигенсвязывающим доменом, таким как верблюжий однодоменный антигенсвязывающий домен.

АОН по изобретению для перенаправления сплайсинга можно вводить непрямым образом при помощи подходящих способов, известных в данной области. Его можно, например, вводить индивидууму или в клетку, ткань или орган указанного индивидуума как таковые, в виде так называемого «голового» АОН. Его также можно вводить в форме экспрессирующего вектора, где экспрессирующий вектор кодирует транскрипт РНК, содержащий последовательность указанного АОН по изобретению. Экспрессирующий вектор предпочтительно вводят в клетку, ткань, орган или индивидууму при помощи носителя для доставки генов. В предпочтительном варианте осуществления предлагается экспрессирующий вектор на основе вируса, содержащий экспрессирующую кассету или транскрипционную кассету, которая управляет экспрессией или транскрипцией АОН по изобретению для перенаправления сплайсинга. Таким образом, изобретение относится к вирусному вектору, экспрессирующему антисмысловой олигонуклеотид по изобретению для перенаправления сплайсинга, который помещен в условия, способствующие экспрессии антисмыслового олигонуклеотида для перенаправления сплайсинга. Клетку можно обеспечивать АОН по изобретению для перенаправления сплайсинга путем экспрессии антисмыслового олигонуклеотида на основе плазмиды или вирусной экспрессии, которая обеспечивается векторами на основе аденовируса или аденоассоциированного вируса. Экспрессия может управляться промотором РНК-полимеразы II (Pol II), таким как РНК-промотор U7 или промотор РНК-полимеразы III (Pol III), такой как РНК-промотор 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 АОН по изобретению для перенаправления сплайсинга можно соответствующим образом применять плазмиды, искусственные хромосомы, плазмиды, используемые для направленной гомологичной рекомбинации и интеграции в геном человека в клетках. Предпочтительными для изобретения являются такие векторы, где транскрипция управляется промоторами PolIII, и/или где транскрипты находятся в форме слияний с транскриптами U1 или



U7, которые дают хорошие результаты для доставки небольших транскриптом. Они известны специалистам в данной области для разработки подходящих транскриптов. Предпочтительными являются транскрипты под управлением PolIII, предпочтительно, в форме слитого транскрипта с транскриптом U1 или U7. Такие слияния можно получать, как описано ранее (Gorman et al., 1998).

Предпочтительная экспрессирующая система для АОН по изобретению для перенаправления сплайсинга представляет собой вектор на основе аденоассоциированного вируса (AAV). Были разработаны одноцепочечные и двухцепочечные векторы на основе AAV, которые можно использовать для длительной экспрессии антисмысловых нуклеотидных последовательностей для высокоэффективного перенаправления сплайсинга. Предпочтительный вектор на основе AAV, например, содержит экспрессирующую кассету, которой управляет промотор РНК-полимеразы III (Pol III) или промотор РНК-полимеразы II (Pol II). Предпочтительным РНК-промотором является, например, РНК-промотор U6 Pol III или РНК-промотор U7 Pol II U7.

Изобретение, таким образом, относится к вектору на основе вируса, содержащему промотор Pol II или Pol III, управляющий экспрессирующей кассетой для экспрессии АОН по изобретению для перенаправления сплайсинга.

Вектор на основе AAV по изобретению представляет собой рекомбинантный вектор на основе AAV и относится к вектору на основе AAV, содержащему часть генома AAV с кодируемым АОН по изобретению для перенаправления сплайсинга, инкапсидированному в белковую оболочку из белка капсида, полученного из серотипа AAV, как описано в другом месте в настоящем документе. Часть генома AAV может содержать инвертированные концевые повторы (ITR), полученные из серотипа аденоассоциированного вируса, такого как AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV8, AAV9 и другие. Белковая оболочка, состоящая из белка капсида, может быть получена из серотипа AAV, такого как AAV1, 2, 3, 4, 5, 8, 9 и другие. Белковую оболочку можно также называть капсидной белковой оболочкой. У вектора на основе AAV может быть удален один ген или предпочтительно все гены AAV дикого типа, но он может все

еще содержать функциональные ITR-последовательности нуклеиновой кислоты. Функциональные ITR-последовательности необходимы для репликации, спасения и упаковки вирионов AAV. ITR-последовательности могут быть последовательностями дикого типа или могут иметь, по меньшей мере, 80%, 85%, 90%, 95, или 100% идентичности последовательности с последовательностями дикого типа или могут быть изменены, например, путем вставки, мутации, делеции или замены нуклеотидов, при условии, что они остаются функциональными. В этом контексте, функциональность относится к способности непосредственно упаковывать геном в капсидную оболочку, а затем обеспечивать экспрессию в инфицированной клетке-хозяине или клетке-мишени. В контексте по изобретению капсидная белковая оболочка может быть из иного серотипа, чем геномные ITR вектора на основе AAV. Вектор на основе AAV в соответствии с настоящим изобретением может, таким образом, состоять из капсидной белковой оболочки, т.е. капсида в виде икосаэдра, который содержит белки капсида (VP1, VP2, и/или VP3) одного из серотипов AAV, например, серотипа 2 AAV, в то время как ITR-последовательности, содержащиеся в этом векторе на основе AAV5, могут быть из любого вышеописанного серотипа AAV, включая вектор на основе AAV2. «Вектор на основе AAV2», таким образом, содержит капсидную белковую оболочку серотипа 2 AAV, в то время как, например, «вектор на основе AAV5» содержит капсидную белковую оболочку серотипа 5 AAV, посредством чего любой из них может инкапсидировать любую геномную ITR вектора на основе AAV.

Предпочтительно, рекомбинантный вектор на основе AAV по изобретению содержит капсидную белковую оболочку серотипа 2, 5, 8 AAV или серотипа 9 AAV, где геном или ITR AAV, присутствующие в указанном векторе на основе AAV, получены из серотипа 2, 5, 8 AAV или серотипа 9 AAV; такой вектор на основе AAV обозначают 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 по изобретению содержит капсидную белковую оболочку серотипа 2

AAV и геном или ITR AAV, присутствующие в указанном векторе на основе AAV, получены из серотипа 5 AAV; такой вектор обозначают как вектор AAV 2/5.

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

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

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

Молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая АОН по изобретению для перенаправления сплайсинга, представленная предпочтительной последовательностью нуклеиновой кислоты, предпочтительно вставлена между геномом или ITR-последовательностями AAV, такой как последовательности, указанные выше, например, экспрессирующая конструкция, содержащая регуляторный элемент экспрессии, функционально связанный с кодирующей последовательностью и 3'-терминирующей последовательностью.

«Хелперные функции AAV», в основном, относятся к соответствующим функциям AAV, необходимым для репликации и упаковки AAV, которые предоставлены в векторе на основе AAV *in trans*. Хелперные функции AAV дополняют функции AAV, которые утрачены в векторе на основе AAV, но у них отсутствуют ITR AAV (которые предоставлены геномом вектора на основе AAV). Хелперные функции AAV включают две главные ORF (открытые рамки считывания) AAV, а именно, кодирующую область *rep* и кодирующую область *cap* или по существу функционально идентичные им последовательности.

Области *Rep* и *Cap* хорошо известны в данной области, см., например, (Chiorini et al., 1999) или US 5139941, включенные в настоящий документ в качестве ссылки. Хелперные функции AAV могут быть предоставлены в хелперной конструкции AAV, которая может быть плазмидой. Введение хелперной конструкции в клетку-хозяина может происходить, например, путем трансформации, трансфекции или трансдукции до или одновременно с введением генома AAV, присутствующего в векторе на основе AAV, как указано в настоящем документе. Хелперные конструкции AAV по изобретению можно выбирать таким образом, что они производят желаемую комбинацию серотипов для капсидной белковой оболочки вектора на основе AAV с одной стороны и для репликации и упаковки генома AAV, присутствующего в указанном векторе на основе AAV, с другой стороны.

«Вирус-помощник AAV» обеспечивает дополнительные функции, необходимые для репликации и упаковки AAV. Подходящие вирусы-помощники AAV включают аденовирусы, вирусы простого герпеса (такие как HSV типов 1 и 2) и вирусы осповакцины. Дополнительные функции, обеспечиваемые вирусом-помощником, можно также вводить в клетку-хозяина посредством векторов, как описано в US 6531456, включенном в настоящий документ в качестве ссылки.

Предпочтительно, геном AAV, который присутствует в рекомбинантном векторе на основе AAV по изобретению, не содержит никаких нуклеотидных последовательностей, кодирующих вирусные белки, такие как гены *rep* (репликация) или *cap* (capsid) AAV. Геном AAV может дополнительно содержать маркер или репортерный ген, такой как ген, например, кодирующий ген устойчивости к антибиотику, флуоресцентный белок (например, *gfp*) или ген, кодирующий химически, ферментативно или иным способом выявляемый и/или селективируемый продукт (например, *lacZ*, *aph* и т.д.), известный в данной области.

Предпочтительно, вектор на основе AAV по изобретению конструируют и производят в соответствии со способом, согласно Garanto et al., 2016, который включен в настоящий документ в качестве ссылки.

Предпочтительный вектор на основе AAV по изобретению

представляет собой вектор на основе AAV, предпочтительно вектор AAV2/5, AAV2/8, AAV2/9 или AAV2/2, экспрессирующий АОН по изобретению для перенаправления сплайсинга, при этом АОН содержит или предпочтительно включает последовательность, которая:

- комплементарна или по существу комплементарна полинуклеотиду с нуклеотидной последовательностью, состоящей из SEQ ID NO: 10, 161, 30, 81, 101, 121, 141 или SEQ ID NO: 261, или их части;

- предпочтительно комплементарна или по существу комплементарна полинуклеотиду с нуклеотидной последовательностью, состоящей из SEQ ID NO: 162, 181, 82, 102, 122, 142 или SEQ ID NO: 262, или их части;

- более предпочтительно комплементарна или по существу комплементарна полинуклеотиду с нуклеотидной последовательностью, состоящей из SEQ ID NO: 160, 180, 80, 100, 120, 140 или SEQ ID NO: 260, или их части

- более предпочтительно комплементарна или по существу комплементарна полинуклеотиду с нуклеотидной последовательностью, состоящей из SEQ ID NO: 11 или SEQ ID NO: 31, или их части;

- более предпочтительно комплементарна или по существу комплементарна полинуклеотиду с нуклеотидной последовательностью, состоящей из SEQ ID NO: 12 или SEQ ID NO: 32, или их части;

- более предпочтительно комплементарна или по существу комплементарна полинуклеотиду с нуклеотидной последовательностью выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 13, 16, 19, 163, 166, 169, 33, 36, 39, 42, 182, 185, 188, 191, 194, 197, 200, 203, 206, 209, 212, 215, 218, 221, 224, 227, 230, 233, 236, 239, 242, 245, 248, 251, 254, 257, 83, 86, 89, 103, 106, 109, 123, 126, 129, 143, 146, 149, 263, 266 и SEQ ID NO: 269, или их части; и

- более предпочтительно комплементарна или по существу комплементарна полинуклеотиду с нуклеотидной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID

NO: 14, 17, 20, 164, 167, 170, 34, 37, 40, 43, 183, 186, 189, 192, 195, 198, 201, 204, 207, 210, 213, 216, 219, 222, 225, 228, 231, 234, 237, 240, 243, 246, 249, 252, 255, 258, 84, 87, 90, 104, 107, 110, 124, 127, 130, 144, 147, 150, 264, 268 и SEQ ID NO: 270, или их части.

Еще более предпочтительный вектор на основе AAV по изобретению представляет собой вектор на основе AAV, предпочтительно вектор AAV2/5, AAV2/8, AAV2/9 или AAV2/2, экспрессирующий молекулу для пропуска экзона или молекулу по изобретению для сохранения экзона 12, которая экспрессирует АОН по изобретению для перенаправления сплайсинга, который содержит, или предпочтительно включает последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 15, 18, 21, 165, 168, 171, 35, 38, 41, 44, 184, 187, 190, 193, 196, 199, 202, 205, 208, 211, 214, 217, 220, 223, 226, 229, 232, 235, 238, 241, 244, 247, 250, 253, 256, 259, 85, 88, 91, 105, 108, 111, 125, 128, 131, 145, 148, 151, 265, 268 и SEQ ID NO: 271.

Ожидается улучшение способов обеспечения индивидуума или клетки, ткани, органа указанного индивидуума АОН по изобретению для перенаправления сплайсинга, учитывая прогресс, который уже был достигнут к настоящему времени. Такие будущие улучшения, конечно, могут быть включены для достижения упомянутого эффекта реструктурирования мРНК при помощи способа по изобретению. АОН по изобретению для перенаправления сплайсинга можно доставлять в виде «голового» АОН индивидууму, клетке, ткани или органу указанного индивидуума. При введении АОН по изобретению для перенаправления сплайсинга, предпочтительно, чтобы молекула растворялась в растворе, который совместим со способом доставки. Клетки сетчатки можно снабжать плазмидой для экспрессии антисмыслового олигонуклеотида, доставляя плазмиду в водном растворе.

Альтернативно, предпочтительным способом доставки для АОН для перенаправления сплайсинга или плазмиды для экспрессии такого АОН является вирусный вектор или наночастицы. Предпочтительно, вирусные векторы или наночастицы доставляют в сетчатку или в другие соответствующие клетки. Такая доставка в

клетки сетчатки или в другие соответствующие клетки может происходить *in vivo*, *in vitro* или *ex vivo*; см. например, Garanto et al, 2016, который включен в настоящий документ в качестве ссылки.

Альтернативно, плазмиду можно доставлять путем трансфекции при помощи известных агентов для трансфекции. Для внутривенного, подкожного, внутримышечного, интратекального и/или внутрижелудочкового введения предпочтительно, чтобы раствор представлял собой физиологический солевой раствор. Особенно предпочтительным в изобретении является применение эксципиентов или агентов для трансфекции, которые будут помогать доставке каждого из компонентов, определенных в настоящем документе, к клетке и/или в клетку, предпочтительно клетку сетчатки. Предпочтительными являются эксципиенты или агенты для трансфекции, способные формировать комплексы, наночастицы, мицеллы, везикулы и/или липосомы, которые доставляют каждый компонент, определенный в настоящем документе, в составе комплекса или захваченный в везикулу или липосому, через мембрану клетки. Множество таких эксципиентов известно в данной области. Подходящие эксципиенты или агенты для трансфекции включают полиэтиленимин (ПЭИ; ExGen500 (MBI Fermentas)), Липофектамин™ 2000 (Invitrogen) или их производные, или аналогичные катионные полимеры, в том числе полипропиленимин или сополимеры полиэтиленимина (ПЭС) и производные, синтетические амфифилы (SAINT-18), липофектин™, DOTAP и/или белки вирусного капсида, которые способны к самосборке в частицы, которые могут доставить каждый компонент, определенный в настоящем документе, к клетке, предпочтительно, клетке сетчатки. Было показано, что такие эксципиенты эффективно доставляют олигонуклеотид, такой как АОН, к широкому спектру культивируемых клеток, включая клетки сетчатки. Их высокий трансфекционный потенциал сочетается с токсичностью от исключительно низкой до умеренной в отношении общей выживаемости клеток. Можно использовать легкость структурной модификации, чтобы проводить дальнейшие модификации и анализ их дополнительных (*in vivo*) характеристик переноса

нуклеиновых кислот и токсичности.

Липофектин представляет собой пример агента для липосомальной трансфекции. Он состоит из двух липидных компонентов, катионного липида N-[1-(2,3-диолеилокси)пропил]-N,N,N-триметилхлорид аммония (DOTMA) (ср. DOTAP, который представляет собой метилсульфатную соль) и нейтрального липида липид диолеилфосфатидилэтаноламина (ДОПЭ). Нейтральный компонент опосредует внутриклеточное высвобождение. Другая группа систем доставки представляет собой полимерные наночастицы.

Поликатионы, такие как диэтиламиноэтиламиноэтил (DEAE)-декстран, которые хорошо известны как реагенты для трансфекции ДНК, можно комбинировать с бутилцианоакрилатом (BCSA) и гексилцианоакрилатом (HCSA) для формирования катионных наночастиц, которые могут доставлять каждый из компонентов, определенных в настоящем документе, предпочтительно АОН по изобретению, через клеточную мембрану в клетки.

В дополнение к этим распространенным материалам наночастиц, катионный пептид протамин предлагает альтернативный подход для формирования состава олигонуклеотида с коллоидами. Эта система коллоидных наночастиц может формировать так называемые прочастицы, которые можно получать путем простого процесса самосборки, для упаковки и внутриклеточного высвобождения олигонуклеотида. Специалист может выбрать и адаптировать любые из вышеуказанных или другие коммерчески доступные альтернативные эксципиенты и системы доставки для упаковки и доставки молекулы для пропуска экзонов для применения в настоящем изобретении для ее доставки для профилактики, лечения или замедления заболевания или состояния, связанного с ABCA4. "Профилактику, лечение или замедление заболевания или состояния, связанного с ABCA4" в настоящем документе предпочтительно определяют как предотвращение, остановку, прекращение прогрессирования, или обращение вспять частичного или полного нарушения зрения или слепоты, которая вызвана генетическим дефектом в гене ABCA4.

Кроме того, АОН по изобретению для перенаправления сплайсинга может быть ковалентно или нековалентно связан с



нацеливающим лигандом, разработанным специально для облегчения захвата в клетку, цитоплазму и/или ядро. Такой лиганд мог бы включать (i) соединение (включая в качестве неограничивающих примеров пептид(-подобные) структуры), распознающее специфические элементы клетки, ткани или органа, облегчающие клеточный захват и/или (ii) химическое соединение, способное облегчить захват в клетки и/или внутриклеточное высвобождение олигонуклеотида из везикул, например, эндосом или лизосом.

Таким образом, в предпочтительном варианте осуществления АОН по изобретению для перенаправления сплайсинга формулируют в состав, или лекарственное средство, или композицию, которая обеспечивает, по меньшей мере, эксципиент и/или нацеливающий лиганд для доставки и/или средство его доставки к клетке и/или улучшение его внутриклеточной доставки.

Следует понимать, что если композиция содержит дополнительный компонент, такой как вспомогательное соединение, как далее определено в настоящем документе, каждый компонент композиции может не быть надлежащим образом сформулирован в одной единственной комбинации, или композиции, или препарате. В зависимости от их индивидуальности и характерных особенностей, специалист будет знать, какой тип состава является наиболее подходящим для каждого компонента, определенного в настоящем документе. В предпочтительном варианте осуществления изобретение относится к композиции или препарату, который находится в форме набора частей, содержащих АОН по изобретению для перенаправления сплайсинга, а также дополнительное вспомогательное соединение, как далее определено в настоящем документе.

Если необходимо и/или при желании, АОН по изобретению для перенаправления сплайсинга или вектор, предпочтительно вирусный вектор по изобретению, экспрессирующий АОН по изобретению для перенаправления сплайсинга, можно вводить в фармацевтически активную смесь путем добавления фармацевтически приемлемого носителя.

Таким образом, изобретение также относится к композиции, предпочтительно, фармацевтической композиции, содержащей АОН по изобретению для перенаправления сплайсинга, или вирусный вектор

по изобретению и фармацевтически приемлемый эксципиент. Такая композиция может содержать один АОН для перенаправления сплайсинга или вирусный вектор по изобретению, но может также содержать несколько различных АОН для перенаправления сплайсинга или вирусных векторов по изобретению. Такая фармацевтическая композиция может содержать любой фармацевтически приемлемый эксципиент, включая носитель, наполнитель, консервант, адъювант, растворитель и/или разбавитель. Такой фармацевтически приемлемый носитель, наполнитель, консервант, адъювант, растворитель и/или разбавитель можно найти, например в Remington, 2000. Каждая отличительная черта указанной композиции была ранее определена в настоящем документе.

Предпочтительным путем введения является инъекция в стекловидное тело водного раствора или специально адаптированного состава для внутриглазного введения. EP2425 814 описывает эмульсию «масло в воде», специально адаптированную для внутриглазного (интравитреального) введения лекарственных средств на основе пептида или нуклеиновой кислоты. Эта эмульсия менее плотная, чем жидкость стекловидного тела, так что эмульсия плавает наверху стекловидного тела, что позволяет избежать того, что введенное лекарственное средство нарушит зрение.

Если используют несколько АОН по изобретению для перенаправления сплайсинга, концентрация или доза, определенные в настоящем документе, могут относиться к общей концентрации или дозе всех использованных олигонуклеотидов или к концентрации или дозе каждой использованной или добавленной молекуле для пропуска экзонов. Таким образом, в варианте осуществления, предлагается композиция, где количество каждого или общее количество использованных АОН по изобретению для перенаправления сплайсинга дозируют в количестве в диапазоне от 0,01 и до 20 мг/кг, предпочтительно от 0,05 и до 20 мг/кг на глаз. Предлагается подходящая интравитреальная доза и она составляет от 0,05 мг и до 5 мг, предпочтительно в пределах от 0,1 до 1 мг на глаз, а именно, приблизительно на глаз: 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9 или 1,0 мг.

Предпочтительный АОН по изобретению для перенаправления

сплайсинга предназначен для лечения заболевания или состояния, связанного с ABCA4, у индивидуума. Во всех вариантах осуществления изобретения, термин "лечение" понимают как предотвращение или замедление заболевания или состояния, связанного с ABCA4. Индивидуум, которого можно бы было лечить при помощи АОН по изобретению для перенаправления сплайсинга, уже был диагностирован как имеющий заболевание или состояние, связанное с ABCA4.

Альтернативно, индивидуум, которого можно бы было лечить при помощи АОН по изобретению для перенаправления сплайсинга, еще не был диагностирован как имеющий заболевание или состояние, связанное с ABCA4, но он может быть индивидуумом с повышенным риском развития заболевания или состояния, связанного с ABCA4, в будущем с учетом его или ее генотипа. Предпочтительный индивидуум является человеком. Во всех вариантах осуществления изобретения, заболевание или состояние, связанное с ABCA4, предпочтительно является болезнью Штаргардта.

Таким образом, изобретение дополнительно относится к АОН по изобретению для перенаправления сплайсинга, или вирусному вектору по изобретению, или (фармацевтической) композиции по изобретению для применения в качестве лекарственного средства, предпочтительно в качестве лекарственного средства для лечения заболевания или состояния, связанного с ABCA4, требующего регуляции сплайсинга ABCA4, и для применения в качестве лекарственного средства для профилактики, лечения или замедления заболевания или состояния, связанного с ABCA4. Каждый признак всех вариантов осуществления медицинского применения в данном документе был ранее определен в данном документе и предпочтительно является таким признаком, как определено ранее в данном документе.

Изобретение дополнительно относится к способу лечения заболевания или состояния, связанного с ABCA4, требующего регуляции сплайсинга ABCA4, указанный способ, включает контакт клетки указанного индивидуума с АОН по изобретению для перенаправления сплайсинга, вектором по изобретению или (фармацевтической) композицией по изобретению. Каждый признак

всех вариантов осуществления медицинского применения в данном документе был ранее определен в данном документе и предпочтительно является таким признаком, как определено ранее в данном документе.

Изобретение дополнительно относится к применению АОН по изобретению для перенаправления сплайсинга, вектора по изобретению или (фармацевтической) композиции по изобретению для получения лекарственного средства. Каждый признак всех вариантов осуществления медицинского применения в данном документе был ранее определен в данном документе и предпочтительно является таким признаком, как определено ранее в данном документе.

Изобретение дополнительно относится к применению АОН по изобретению для перенаправления сплайсинга, вектора по изобретению или (фармацевтической) композиции по изобретению для получения лекарственного средства для лечения заболевания или состояния, связанного с ABCA4, требующего регуляции сплайсинга ABCA4. Каждый признак всех вариантов осуществления медицинского применения в данном документе был ранее определен в данном документе и предпочтительно является таким признаком, как определено ранее в данном документе.

Изобретение дополнительно относится к применению АОН по изобретению для перенаправления сплайсинга, вектора по изобретению или (фармацевтической) композиции по изобретению для лечения заболевания или состояния, связанного с ABCA4, требующего регуляции сплайсинга ABCA4. Каждый признак всех вариантов осуществления медицинского применения в данном документе был ранее определен в данном документе и предпочтительно является таким признаком, как определено ранее в данном документе.

Лечение при применении или при способе по изобретению проводят предпочтительно, по меньшей мере, однократно, и предпочтительно оно длится, по меньшей мере, одну неделю, один месяц, несколько месяцев, один год, 2, 3, 4, 5, 6 лет или дольше, а именно, всю жизнь. Каждый АОН по изобретению для перенаправления сплайсинга или его эквивалент, как определено в настоящем документе, для применения по изобретению может быть

подходящим для прямого введения *in vivo* в клетку, ткань и/или орган индивидуумов, уже заболевших или с риском развития заболевания или состояния, связанного с ABCA4, и его можно вводить *in vivo*, *ex vivo* или *in vitro*. Частота введения АОН, композиции, соединения или вспомогательного соединения по изобретению может зависеть от нескольких параметров, таких как тяжесть заболевания, возраст пациента, мутация пациента, количество АОН по изобретению для перенаправления сплайсинга (т.е. доза), состав АОН, композиции, соединения или вспомогательного соединения по изобретению, путь введения и т.д. Частота введения может варьировать в пределах ежедневной, еженедельной, по меньшей мере, раз в две недели, или три недели, или четыре недели, или пять недель или в течение более долгого периода времени.

Диапазон доз АОН, композиции, соединения или вспомогательного соединения по изобретению предпочтительно разрабатывают на основании исследований с повышающимися дозами в клинических испытаниях (применение *in vivo*), для которых существуют строгие требования протокола. АОН по 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 будет находиться между 0,05 мг и 5 мг, предпочтительно, между 0,1 и 1 мг на глаз, а именно, приблизительно на глаз: 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9 или 1,0 мг.

В предпочтительном варианте осуществления используют концентрацию олигонуклеотида, определенного в настоящем документе, которая находится в диапазоне от 0,1 нМ до 1 мкМ. Предпочтительно, этот диапазон предназначен для применения *in vitro* на клеточной модели, такой как клетки сетчатки или ткань сетчатки. Более предпочтительно, применяемая концентрация находится в диапазоне от 1 до 400 нМ, даже более предпочтительно, от 10 до 200 нМ, даже более предпочтительно, от 50 до 100 нМ. Если применяют несколько различных АОН, эта концентрация или доза может относиться к общей концентрации или дозе АОН или к концентрации или дозе каждого из добавленных АОН.

В предпочтительном варианте осуществления вирусный вектор, предпочтительно, вектор на основе AAV, описанный ранее в настоящем документе, в качестве носителя для доставки молекулы по изобретению, вводят в дозе в диапазоне от  $1 \times 10^9$ – $1 \times 10^{17}$  вирусных частиц на инъекцию, более предпочтительно, от  $1 \times 10^{10}$ – $1 \times 10^{12}$  вирусных частиц на инъекцию.

Диапазоны концентрации или дозы АОН, показанные выше, представляют собой предпочтительные концентрации или дозы для применений *in vivo*, *in vitro* или *ex vivo*. Специалисту будет понятно, что в зависимости от использованных АОН, клетки-мишени, которую обрабатывают, гена-мишени и его уровней экспрессии, использованной среды и условий трансфекции и инкубации, концентрация или доза использованных АОН может дополнительно варьировать и потребовать дальнейшей оптимизации.

АОН по изобретению для перенаправления сплайсинга, или вирусный вектор по изобретению, или композицию по изобретению для применения по изобретению можно вводить *in vivo* в клетку, ткань и/или орган индивидуумов, уже заболевших или с риском развития заболевания или состояния, связанного с ABCA4, и можно вводить *in vivo*, *ex vivo* или *in vitro*. АОН по изобретению для перенаправления сплайсинга, или вирусный вектор по изобретению, или композицию по изобретению можно вводить *in vivo* напрямую или опосредованно в клетку, ткань и/или орган индивидуума, уже заболевшего или с риском развития заболевания или состояния, связанного с ABCA4, и можно вводить напрямую или опосредованно *in vivo*, *ex vivo* или *in vitro*. Поскольку болезнь Штаргардта имеет ярко выраженный фенотип в клетках сетчатки, предпочтительно, чтобы указанные клетки-мишени представляли собой клетки сетчатки, еще более предпочтительно, что указанная ткань представляет собой сетчатку, и еще более предпочтительно, что указанный орган содержит или включает в себя глаз.

Изобретение дополнительно относится к способу модуляции сплайсинга ABCA4 в клетке, включающему контакт клетки, предпочтительно, клетки сетчатки, с АОН по изобретению для перенаправления сплайсинга, или вирусным вектором по

изобретению, или (фармацевтической) композицией по изобретению. Отличительные признаки этого аспекта предпочтительно являются признаками, ранее определенными в настоящем документе. Контакт клетки с АОН по изобретению для перенаправления сплайсинга, или вирусным вектором по изобретению, или композицией по изобретению можно проводить любым способом, известным специалисту в данной области. Включено применение способов для доставки АОН для перенаправления сплайсинга, вирусных векторов и композиций, как описано ранее в настоящем документе. Контакт может быть прямым или опосредованным и может быть *in vivo*, *ex vivo* или *in vitro*.

Если не указано иначе, каждый вариант осуществления, описанный в настоящем документе, можно комбинировать с другим вариантом осуществления, описанным в настоящем документе.

### **Определения**

В этом документе и в его формуле изобретения глагол «содержать» и его спряжения в его неограничивающем смысле означают, что элементы, следующие за словом, включены, но элементы, конкретно не упомянутые, не исключены. Кроме того, ссылка на элемент неопределенным артиклем «а» или «an» не исключает возможности присутствия более чем одного элемента, если контекст явно не требует наличия одного и только одного из элементов. Неопределенный артикль «а» или «an», таким образом, как правило, означает «по меньшей мере один».

Слово «приблизительный» или «приблизительно» при использовании в сочетании с числовым значением (например, приблизительно 10) предпочтительно означает, что значением может быть заданное значение (из 10) на 5% больше или меньше от значения.

Информация о последовательностях, представленная в данном документе, не должна толковаться так узко, чтобы требовать включения ошибочно идентифицированного основания. Специалист способен выявить такие ошибочно идентифицированные основания и знает, как исправить такие ошибки. В случае ошибок последовательности преимущество будет иметь последовательность полипептида, которую можно получить путем экспрессии гена, присутствующего в SEQ ID NO: 1, содержащая последовательность

нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид.

Все патентные и литературные ссылки, процитированные в настоящем описании, таким образом, включены в качестве ссылки в полном объеме.

### **Варианты осуществления изобретения**

1. Антисмысловой олигонуклеотид для перенаправления сплайсинга, который:

- комплементарен или по существу комплементарен полинуклеотиду с нуклеотидной последовательностью, состоящей из SEQ ID NO: 10 или SEQ ID NO: 30, или их части;

- предпочтительно комплементарен или по существу комплементарен полинуклеотиду с нуклеотидной последовательностью, состоящей из SEQ ID NO: 11 или SEQ ID NO: 31, или их части;

- более предпочтительно комплементарен или по существу комплементарен полинуклеотиду с нуклеотидной последовательностью, состоящей из SEQ ID NO: 12 или SEQ ID NO: 32, или их части;

- более предпочтительно комплементарен или по существу комплементарен полинуклеотиду с нуклеотидной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 39 и SEQ ID NO: 42, или их части; и

- более предпочтительно комплементарен или по существу комплементарен полинуклеотиду с нуклеотидной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 40 и SEQ ID NO: 43, или их части.

2. Антисмысловой олигонуклеотид для перенаправления сплайсинга в соответствии с вариантом осуществления 1, где часть, которая комплементарна или по существу комплементарна полинуклеотиду с нуклеотидной последовательностью, состоящей из SEQ ID NO: 10 или SEQ ID NO: 30, или их части, имеет длину приблизительно от 8 до приблизительно 40 нуклеотидов, предпочтительно, приблизительно от 10 до приблизительно 40 нуклеотидов, более предпочтительно, приблизительно от 14 до



приблизительно 30 нуклеотидов, более предпочтительно, приблизительно от 16 до приблизительно 24 нуклеотидов, а именно, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 или 24 нуклеотидов.

3. Антисмысловой олигонуклеотид для перенаправления сплайсинга в соответствии с любым из предшествующих вариантов осуществления, который имеет длину приблизительно от 8 до приблизительно 100 нуклеотидов, предпочтительно, приблизительно от 10 до приблизительно 40 нуклеотидов, более предпочтительно, приблизительно от 14 до приблизительно 30 нуклеотидов, более предпочтительно, приблизительно от 16 до приблизительно 24 нуклеотидов, а именно, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 или 24 нуклеотидов.

4. Антисмысловой олигонуклеотид для перенаправления сплайсинга в соответствии с любым из предшествующих вариантов осуществления, где указанный антисмысловой олигонуклеотид содержит или включает последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 41 и SEQ ID NO: 44.

5. Антисмысловой олигонуклеотид для перенаправления сплайсинга в соответствии с любым из предшествующих вариантов осуществления, содержащий, по меньшей мере, один рибонуклеотид.

6. Антисмысловой олигонуклеотид для перенаправления сплайсинга в соответствии с любым из предшествующих вариантов осуществления, содержащий, по меньшей мере, один мотив ESE (экзонного энхансера сплайсинга).

7. Антисмысловой олигонуклеотид для перенаправления сплайсинга в соответствии с любым из предшествующих вариантов осуществления, содержащий 2'-O алкилтиофосфатный антисмысловой олигонуклеотид, такой как 2'-O-метил модифицированная рибоза (РНК), 2'-O-этил модифицированная рибоза, 2'-O-пропил модифицированная рибоза, и/или замещенные производные этих модификаций, такие как галогенированные производные.

8. Вирусный вектор, экспрессирующий антисмысловой олигонуклеотид для перенаправления сплайсинга в соответствии с любым из предшествующих вариантов осуществления, в условиях, способствующих экспрессии антисмыслового олигонуклеотида для

пропуска экзона.

9. Фармацевтическая композиция, содержащая антисмысловой олигонуклеотид для перенаправления сплайсинга в соответствии с любым из вариантов осуществления 1-7, или вирусный вектор в соответствии с вариантом осуществления 7 и фармацевтически приемлемый эксципиент.

10. Фармацевтическая композиция в соответствии с вариантом осуществления 9, где фармацевтическая композиция предназначена для интравитреального введения и вводится в дозе от 0,05 мг до 5 мг для общего количества антисмысловых олигонуклеотидов для перенаправления сплайсинга на глаз.

11. Фармацевтическая композиция в соответствии с вариантом осуществления 10, где фармацевтическая композиция предназначена для интравитреального введения и вводится в дозе от 0,1 до 1 мг для общего количества антисмысловых олигонуклеотидов для перенаправления сплайсинга на глаз, а именно, приблизительно 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9 или 1,0 мг общего количества антисмысловых олигонуклеотидов для перенаправления сплайсинга на глаз.

12. Антисмысловой олигонуклеотид для перенаправления сплайсинга в соответствии с любым из вариантов осуществления 1-7, вектор в соответствии с вариантом осуществления 8 или композиция в соответствии с любым из вариантов осуществления 9-11 для применения в качестве лекарственного средства.

13. Антисмысловой олигонуклеотид для перенаправления сплайсинга в соответствии с любым из вариантов осуществления 1-7, вектор в соответствии с вариантом осуществления 9 или композиция в соответствии с любым из вариантов осуществления 9-11 для применения для лечения заболевания или состояния, связанного с ABCA4, требующего регуляции сплайсинга ABCA4.

14. Применение антисмыслового олигонуклеотида для перенаправления сплайсинга в соответствии с любым из вариантов осуществления 1-7, вектор в соответствии с вариантом осуществления 8 или композиция в соответствии с любым из вариантов осуществления 9-11 для получения лекарственного средства.

15. Применение антисмыслового олигонуклеотида для перенаправления сплайсинга в соответствии с любым из вариантов осуществления 1-6, вектор в соответствии с вариантом осуществления 7 или композиция в соответствии с любым из вариантов осуществления 8-10 для получения лекарственного средства для лечения заболевания или состояния, связанного с АВСА4, требующего регуляции сплайсинга АВСА4.

16. Применение антисмыслового олигонуклеотида для перенаправления сплайсинга в соответствии с любым из вариантов осуществления 1-7, вектор в соответствии с вариантом осуществления 7 или композиция в соответствии с любым из вариантов осуществления 9-11 для лечения заболевания или состояния, связанного с АВСА4, требующего регуляции сплайсинга АВСА4.

17. Способ регуляции сплайсинга АВСА4 в клетке, указанный способ включает контакт указанной клетки с антисмысловым олигонуклеотидом для перенаправления сплайсинга, определенным в любом из вариантов осуществления 1-7, вектором в соответствии с вариантом осуществления 7 или композицией в соответствии с любым из вариантов осуществления 9-11.

18. Способ лечения заболевания или состояния, связанного с АВСА4, требующего регуляции сплайсинга АВСА4, у нуждающегося в этом индивидуума, указанный способ включает контакт клетки указанного с антисмысловым олигонуклеотидом для перенаправления сплайсинга, определенным в любом из вариантов осуществления 1-7, вектором в соответствии с вариантом осуществления 7 или композицией в соответствии с любым из вариантов осуществления 9-11.

19. Антисмысловой олигонуклеотид для перенаправления сплайсинга для применения в соответствии с вариантом осуществления 12 или 13, применение в соответствии с вариантом осуществления 15 или 16 или способ в соответствии с вариантом осуществления 18, где заболевание или состояние, связанное с АВСА4, представляет собой болезнь Штаргардта.

#### **Примеры**

Сначала мы оценивали *in vitro* эффективность ряда АОН по

перенаправлению дефектов сплайсинга, вызванных мутациями с.4539+1100A>G, с.4539+1106C>T и с.4539+2001G>A в *ABCA4*, на клетках эмбриональной почки человека (HEK293T). Для этого мы использовали конструкции минигенов, т.е. плазмиды, которые несут последовательность части гена *ABCA4*, как правило, интересующую область с наличием или отсутствием мутации, фланкированную с каждой стороны, по меньшей мере, 500 п.н. последовательности *ABCA4* дикого типа. Плазида также содержит последовательности экзонов и границы экзон-интрон экзонов 3 и 5 гена *RHO* на каждой стороне последовательности *ABCA4*, соответственно. Таким образом, можно легко измерить воздействие варианта *ABCA4* на сплайсинг соответствующего экзона или псевдоэкзонов. Затем, мы использовали более крупные конструкции (называемые мидигенами) для оценки характера других вариантов глубоко в интроне, которые были обнаружены, в том числе с.769-784C>T, с.859-540C>G, с.859-506G>C, с.1937+435C>G, с.4539+1100A>G, с.4539+1106C>T и с.5197-557G>T. Получение этих мидигенов описано в Sangermano et al. (2018) Наконец, в дополнение к анализу минигенов, мы также использовали клетки-предшественники фоторецепторов (RPC) от пациента с комбинацией мутаций *ABCA4*, а именно мутации с.4539+2001G>A вместе с с.4892T>C (p.Leu1631Pro) на другом аллеле, для оценки потенциала АОН по избеганию дефектов сплайсинга. Также для оценки потенциала АОН по избеганию дефектов сплайсинга использовали RPC от пациента с комплексным аллелем, содержащим с.302+68>>T и с.4539+2028C>T (M2), и делецией с.6148-698\_6670delinsTGTGCACCTCCCTAG на другом аллеле (Lee et al. 2016). Сначала в разделе Материалы и способы описаны детали эксперимента, в то время как результаты описаны и проиллюстрированы далее в разделе Результаты.

#### Материалы и способы

##### **А) Мутации: с.4539+1100A>G & с.4539+1106C>T - минигены**

##### **Получение минигена для каждой мутации**

Был создан миниген, включающий часть интрона 29, полностью экзон 30, интрон 30 и экзон 31, и часть интрона 31. Эту геномную область клонировали в вектор pCI-Neo-Rhodopsin при помощи

Gateway System. Полученный вектор (называемый pCI-Neo-Rho-ABCA4-30-31 дикого типа, SEQ ID NO: 50) использовали для введения мутаций с.4539+1100A>G и с.4539+1106C>T путем сайт-специфического мутагенеза (новый вектор назвали pCI-Neo-Rho-ABCA4-с.4539+1100G, SEQ ID NO: 51 и pCI-Neo-Rho-ABCA4-с.4539+1106T, SEQ ID NO: 52). Контрольный и мутированный векторы подтверждали секвенированием по Сэнгеру. Минигенами затем трансфицировали клетки HEK293T, которые собирали через 48 часов после трансфекции и проводили анализ ОТ-ПЦР для того чтобы выявить дефект сплайсинга.

#### **Конструирование и тестирование АОН**

Анализ РНК клеток HEK293T, трансфицированных минигенами, показал дефект сплайсинга пре-мРНК, который заключается во вставке псевдоэкзона. Были сконструированы несколько АОН с использованием последовательности этого псевдоэкзона. Затем, АОН трансфицировали HEK293T совместно с минигенами. Для подтверждения эффективности АОН, проводили анализ ОТ-ПЦР на клетках. Эффективность каждого из АОН оценивали, доставляя одинаковые количества минигена и различные концентрации АОН и проводя после этого анализ ОТ-ПЦР.

#### **Анализ ОТ-ПЦР**

Выделяли тотальную РНК с использованием набора NucleoSpin RNA Clean-up (каталожный № 740955-50; Macherey-Nagel, Düren, Germany) по протоколу производителя. Определяли количество РНК и синтезировали кДНК из 1 мкг РНК с использованием набора iScript cDNA synthesis (каталожный №, 1708891; Bio-Rad, Hercules, CA) по инструкциям производителя. Наконец, оценивали эффективность АОН, проводя ПЦР от экзона 30 до экзона 31 или ПЦР, покрывающую область от экзона 29 до 34.

#### **В) Мутация: с.4539+2001G>A - миниген**

##### **Получение минигена**

Был создан миниген, включающий часть интрона 29, полностью экзон 30, интрон 30 и экзон 31, и часть интрона 31. Эту геномную область клонировали в вектор pCI-Neo-Rhodopsin при помощи Gateway System. Полученный вектор (называемый pCI-Neo-Rho-ABCA4-30-31 дикого типа, SEQ ID NO: 50) использовали для введения

мутации с.4539+2001G>A мутация путем сайт-специфического мутагенеза (новый вектор назвали pCI-Neo-Rho-ABCA4-с.4539+2001A, SEQ ID NO: 53). Контрольный и мутированный векторы подтверждали секвенированием по Сэнгеру. Минигенами затем трансфицировали клетки HEK293T, которые собирали через 48 часов после трансфекции и проводили анализ ОТ-ПЦР для того чтобы выявить дефект сплайсинга.

#### **Конструирование и тестирование АОН**

Трансфекция минигеном pCI-Neo-Rho-ABCA4-с.4539+2001A клеток HEK293T показала вставку псевдоэкзона. Были сконструированы несколько АОН с использованием последовательности этого псевдоэкзона. АОН доставляли в клетки HEK293T вместе с минигеном. Проводили анализ РНК трансфицированных клеток.

#### **Анализ РНК**

Выделяли тотальную РНК с использованием набора NucleoSpin RNA Clean-up (каталожный № 740955-50; Macherey-Nagel, Düren, Germany) по протоколу производителя. Определяли количество РНК и синтезировали кДНК из 1 мкг РНК с использованием набора iScript cDNA synthesis (каталожный №, 1708891; Bio-Rad, Hercules, CA) по инструкциям производителя. Наконец, оценивали эффективность АОН, проводя ПЦР от экзона 30 до экзона 31 или ПЦР, покрывающую область от экзона 29 до 34.

#### **С) Мутации: с.4539+2001G>А и с.4539+2028C>Т - оценка РРС**

##### **Получение клеток-предшественников фоторецепторов (РРС)**

Получали биопсию кожи пациента с гетерозиготной мутацией с.4539+2001G>А (M1) и пациента с гетерозиготной мутацией с.4539+2028C>Т (M2), и получали клеточные линии фибробластов. Затем, перепрограммировали индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (iPSCs), как описано ранее (Sangermano et al., 2016), и дифференцировали в клетки-предшественники фоторецепторов (РРС) с использованием способа, адаптированного Sangermano et al. (2016) или Flamier et al. (2016). Проводили анализ ОТ-ПЦР на дифференцированных клетках.

#### **Анализ транскрипта ABCA4**

Через тридцать суток дифференцировки, собирали контрольные

и полученные от пациентов РРС. Проводили анализ путем ПЦР с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) с использованием праймеров, расположенных в экзоне 2 (прямой) и экзоне 5 (обратный) или экзоне 30 (прямой) и экзоне 31 (прямой) гена *ABCA4*. В качестве контроля использовали праймеры актина (*ACTB*). Последовательности праймеров представлены в SEQ ID NO: 54-77. Все реакционные смеси (50 мкл) содержали 10 мкМ каждой пары праймеров, *Taq* ДНК-полимеразу, 1 Ед/мкл (каталожный номер 11647679001, Roche, Basel, Switzerland), 10× буфер для ПЦР без  $MgCl_2$ , 25 мМ  $MgCl_2$ , 10 мМ dNTPs, и 50 нг кДНК. Условия ПЦР представляли собой первый этап денатурации при 94°C в течение 5 минут с последующими 35 циклами с этапами плавления (94°C в течение 30 секунд), отжига (58°C в течение 30 секунд), и удлинения (72°C в течение 1 минуты), с финальным этапом элонгации при 72°C в течение 5 минут. Продукты ПЦР разделяли на 1% (масс./об.) агарозном геле и полученные полосы вырезали и очищали с помощью набора NucleoSpin®Gel&PCR cleanup (каталожный номер 740609,250, Macherey-Nagel) по протоколу производителя. Наконец, 100 нг очищенного продукта ПЦР анализировали путем секвенирования по Сэнгеру на анализаторе ДНК 3100 или 3730 (Thermo Fisher Scientific).

#### **Конструирование антисмыслового олигонуклеотида (АОН)**

Последовательность ПЭ плюс 50 пар оснований, фланкирующих обе стороны, анализировали, как описано ранее (Aartsma-Rus et al. 2012). В кратком изложении, в целом структуру РНК интересующей области анализировали при помощи программы *mfold* (<http://unafold.rna.albany.edu/?q=mfold/РНК-Folding-Form>, последний доступ 23-07-2017), для того чтобы выявить частично открытые и закрытые области. Мотивы энхансера сплайсинга определяли при помощи *ESE finder 3.0* ([http://krainer01.cshl.edu/cgi-bin/tools/ESE3/ese\\_finder.cgi?process=home](http://krainer01.cshl.edu/cgi-bin/tools/ESE3/ese_finder.cgi?process=home), последний доступ 23-07-2017). Особое внимание уделяли областям SC35, поскольку было показано, что существует положительная корреляция между присутствием таких мотивов и эффективностью АОН (Aartsma-Rus et

al. 2012). Сначала, этот анализ привел к разработке четырех АОН, двух, которые перекрывали мотив SC35 с наивысшей оценкой (АОН2 и АОН3), одному на 5'-конце ПЭ (АОН4) и одному, который перекрывался с мутацией с.4539+2001G>A (АОН1). На последующем этапе, были разработаны 22 дополнительных АОН, для поиска корреляций между эффективностью АОН и их положением относительно псевдоэкзона, их перекрытием с определенными мотивами ESE, и их специфичностью (т.е. могут ли нарушения комплементарности единичных нуклеотидов аннулировать их эффективность). Окончательные последовательности АОН также оценивали по свободной энергии молекулы отдельно, возможности образования димеров, и их взаимодействие с интересующей областью. Для этого, применяли инструмент для вторичной структуры РНК (<http://rna.urmc.rochester.edu/RNAstructureWeb>, последний доступ 23-07-2017), используя инструменты для вторичной структуры РНК и предсказания двойного складывания. Мы убедились, что все АОН имели значение свободной энергии выше -4 по отдельности, выше -14 в виде димера и между 21 и 28 для АОН-область связывания. Рассчитывали с использованием расчетной энергии интересующей области минус энергия АОН, связавшегося с областью. Все последовательности АОН имели длину 19 нуклеотидов с  $T_m$  выше 46°C и содержанием GC между 40% и 65%. Последовательности и свойства АОН перечислены в таблице 1; дополнительные свойства АОН для псевдоэкзона 30-31 (345) перечислены в таблице 2. АОН были химически модифицированы добавлением тиофосфатного остова и 2-О-метильной модификации сахара 2OMe/PS к каждому нуклеотиду, и их приобретали у Eurogentec (Liège, Belgium). АОН растворяли в PBS 1X (дважды автоклавированном) до конечной концентрации 100 мкМ. Были заказаны два смысловых олигонуклеотида (SON-1 [SEQ ID NO: 280] и SON-2 [SEQ ID NO: 281]) с такой же химией для использования в качестве отрицательного контроля.

### **Обработка АОН**

После дифференцировки, РРС обрабатывали АОН (0,5 и 1 мкМ), смешивая «голые» АОН непосредственно со средой для культивирования. Через 24 часа, добавляли циклогексимид (CHX,



каталожный номер C4859, Sigma Aldrich) в конечной концентрации 0,1 мг/мл и инкубировали клетки еще 24 часа. Через 48 часов после доставки АОН клетки собирали, промывали PBS и выделяли РНК. Синтез кДНК проводили с использованием 1 мкг РНК, как описано выше. Все реакции разбавляли до 20 нг/мкл, добавляя 30 мкл дистиллированной воды. Для анализа ОТ-ПЦР, использовали 80 нг кДНК для всех реакций с АВСА4, и 40 нг для анализа с АСТВ. Все реакционные смеси (25 мкл) содержали 10 мкМ каждой пары праймеров, Taq ДНК-полимеразу, 1 Ед/мкл (каталожный номер 11647679001, Roche), 10× буфер для ПЦР с MgCl<sub>2</sub>, дополненный 1 мМ MgCl<sub>2</sub>, 2 мкМ dNTPs, и 80 или 40 нг кДНК. Условия ПЦР для фрагментов АВСА4 с экзона 30 до 31 были следующими: 94°C в течение 2 минут, 35 циклов из 30 секунд при 94°C, 30 секунд при 58°C и 90 секунд при 72°C, с последующим финальным этапом из 2 минут при 72°C. Для амплификации актина ПЦР проводили в тех же условиях, за исключением времени элонгации 30 секунд. Полный объем продуктов ПЦР для АВСА4 и 10 мкл ампликона актина разделяли на 2% (масс./об.) агарозном геле. Полученные полосы анализировали с использованием Секвенирования по Сэнгеру. Соотношение между правильно и неправильно сплайсированными вариантами оценивали с использованием программы Fiji (Schindelin et al., 2012).

**D) Мутации: с.769-784С>Т, с.859-540С>G, с.859-506G>С, с.1937+435С>G, с.4539+1100А>G, с.4539+1106С>Т и с.5197-557G>Т - мидигены**

#### **Получение мидигена для каждой мутации**

Был создан мидиген для каждой мутации (Sangermano et al. 2018). Эти мидигены включали существенный фрагмент геномной ДНК АВСА4 на каждой стороне соответствующих мутаций, часто охватывающий один или несколько фланкирующих экзонов. Эту геномную область клонировали в вектор pCI-Neo-Rhodopsin с использованием Gateway System. Полученные векторы (pCI-Neo-Rho-ABCA4-intron6-intron7 дикого типа (SEQ ID NO: 290), pCI-Neo-Rho-ABCA4-intron6-intron11 дикого типа (SEQ ID NO: 292), pCI-Neo-Rho-ABCA4-intron11-intron15 дикого типа (SEQ ID NO: 295), pCI-

Neo-Rho-ABCA4-intron29-intron32 дикого типа (SEQ ID NO: 297), pCI-Neo-Rho-ABCA4-intron31-intron37 дикого типа (SEQ ID NO: 300)) применяли для введения мутаций с.769-784C>T, с.859-540C>G, с.859-506G>C, с.1937+435C>G, с.4539+1100A>G, с.4539+1106C>T и с.5197-557G>T в соответствующий вектор путем сайт-специфического мутагенеза (новые векторы назвали pCI-Neo-Rho-ABCA4-intron6-intron7 с.769-784T (SEQ ID NO: 291), pCI-Neo-Rho-ABCA4-intron6-intron11 с.859-540G (SEQ ID NO: 293), pCI-Neo-Rho-ABCA4-intron6-intron11 с.859-506C (SEQ ID NO: 294), pCI-Neo-Rho-ABCA4-intron11-intron15 с.1937+435G (SEQ ID NO: 296), pCI-Neo-Rho-ABCA4-intron29-intron32 с.4539+1100G (SEQ ID NO: 298), pCI-Neo-Rho-ABCA4-intron29-intron32 с.4539+1106T (SEQ ID NO: 299) и pCI-Neo-Rho-ABCA4-intron31-intron37 с.5197-557T (SEQ ID NO: 301)). Контрольный и мутированный векторы подтверждали секвенированием по Сэнгеру. Мидигенами затем трансфицировали клетки HEK293T, которые собирали через 48 часов после трансфекции и проводили анализ ОТ-ПЦР для того чтобы выявить дефект сплайсинга.

#### **Конструирование и тестирование АОН**

Анализ РНК клеток HEK293T, трансфицированных мидигенами, показал дефект сплайсинга пре-мРНК, который заключается во вставке псевдоэкзона. Были сконструированы несколько АОН с использованием последовательности этого псевдоэкзона. Затем, АОН трансфицировали HEK293T совместно с мидигенами. Для подтверждения эффективности АОН, проводили анализ ОТ-ПЦР на клетках. Эффективность каждого из АОН оценивали, доставляя одинаковые количества мидигена и различные концентрации АОН и проводя после этого анализ ОТ-ПЦР. В каждый эксперимент был включен один SON в качестве отрицательного контроля. Во время окончательной проверки мы обнаружили, что АОН1, который был разработан для мутации с.859-540C>G был заказан неправильно, и вместо него была введена и получена последовательность АОН3 для мутации с.5197-557G>T. Это также повлияло на интерпретацию результатов.

#### **Анализ ОТ-ПЦР**

Выделяли тотальную РНК с использованием набора NucleoSpin

RNA Clean-up (каталожный № 740955-50; Macherey-Nagel, Düren, Germany) по протоколу производителя. Определяли количество РНК и синтезировали кДНК из 1 мкг РНК с использованием набора iScript cDNA synthesis (каталожный №, 1708891; Bio-Rad, Hercules, CA) по инструкциям производителя. Наконец, оценивали эффективность АОН, проводя ПЦР с использованием соответствующих праймеров ABCA4 (SEQ ID NO: 302, родопсин ex3 fw; SEQ ID NO: 303, ABCA4 ex7 rev; SEQ ID NO: 304, ABCA4 ex7 fw; SEQ ID NO: 305, ABCA4 ex8 rev; SEQ ID NO: 306, ABCA4 ex13 fw; SEQ ID NO: 307, ABCA4 ex14 rev; SEQ ID NO: 308, ABCA4 ex30 fw; SEQ ID NO: 309, ABCA4 ex32 rev; SEQ ID NO: 310, ABCA4 ex32 tw; SEQ ID NO: 311, ABCA4 ex37 rev).

### **Результаты**

**А)** Минигенными конструкциями с мутацией с.4539+1100A>G или с.4539+1106C>T трансфицировали клетки НЕК293Т вместе с конструкцией с последовательностью ABCA4 дикого типа. Как показано на фигуре 1, обе мутации приводят к вставке псевдоэкзона размером 86 п.н. в транскрипт (дорожки, помеченные NT), хотя были также выявлены некоторые оставшиеся транскрипты дикого типа. Трансфекция тремя различными АОН показала, что для обеих мутаций вставка псевдоэкзона была полностью отменена в присутствии АОН1 (АОН-1 для псевдоэкзона 30-31(68), SEQ ID NO: 15), и АОН2 (АОН-2 для псевдоэкзона 30-31(68), SEQ ID NO: 18), в то время как АОН3 (АОН-3 для псевдоэкзона 30-31(68), SEQ ID NO: 21) привел к частичному перенаправлению событий сплайсинга (фигура 1). Эти данные демонстрируют способность АОН перенаправлять события нарушенного сплайсинга, вызванные мутациями с.4539+1100A>G или с.4539+1106C>T.

**В)** Минигенной конструкцией с мутацией с.4539+2001A>G (А) трансфицировали клетки НЕК293Т вместе с конструкцией с последовательностью ABCA4 дикого типа (G). Минигенной конструкцией с мутацией с.4539+2001G>А трансфицировали клетки НЕК293Т вместе с конструкцией с последовательностью ABCA4 дикого типа. Анализ ОТ-ПЦР с использованием РНК, полученной из этих клеток выявил включение псевдоэкзона, соответствующего последовательности размером 345 п.н. в интрон 30, но только

когда клетки культивировали в присутствии циклогексимида (+CHX), вещества, которое постоянно используют для подавления нонсенс-опосредованной деградациии неправильных транскриптов. Как показано на фигуре 3, все четыре АОН (АОН1=АОН-1 для псевдоэкзона 30-31(345), SEQ ID NO: 35, АОН2= АОН-2 для псевдоэкзона 30-31(345), SEQ ID NO: 38, АОН3=АОН-3 для псевдоэкзона 30-31(345), SEQ ID NO: 41, АОН4= АОН-4 для псевдоэкзона 30-31(345), SEQ ID NO: 44),) полностью перенаправляли сплайсинг *ABCA4* в отличие от SON. При использовании конструкции WT (левая дорожка), как и ожидалось, был выявлен только интактный продукт без псевдоэкзона. В настоящем документе АОН взаимозаменяемо обозначены как АОН-*n* и АОН*n*, где *n* представляет собой целое число; АОН могут быть показаны с «-» или без «-».

**С)** В клетках-предшественниках фоторецепторов, полученных от пациента, гетерозиготного по мутации с.4539+2001G>А (M1) *ABCA4*, анализ ОТ-ПЦР с использованием РНК, полученной из этих клеток выявил включение псевдоэкзона, соответствующего последовательности размером 345 п.н. в интрон 30, но только когда клетки культивировали в присутствии циклогексимида (+CHX), вещества, которое постоянно используют для подавления нонсенс-опосредованной деградациии неправильных транскриптов. Как показано на фигуре 2, после трансфекции четырьмя различными АОН, нацеленными на этот псевдоэкзон (АОН1=АОН-1 для псевдоэкзона 30-31(345), SEQ ID NO: 35, АОН2= АОН-2 для псевдоэкзона 30-31(345), SEQ ID NO: 38, АОН3=АОН-3 для псевдоэкзона 30-31(345), SEQ ID NO: 41, АОН4= АОН-4 для псевдоэкзона 30-31(345), SEQ ID NO: 44), вставка псевдоэкзона полностью исчезла после введения АОН1 и АОН4. Этого не произошло в случае отрицательного контроля олиго SON (SEQ ID NO: 45), который имеет последовательность, комплементарную АОН1, что демонстрирует, что АОН1 и АОН4 эффективно и специфически перенаправляют события нарушенного сплайсинга, вызванные мутацией с.4539+2001G>А.

Чтобы определить, приводят ли варианты с.4539+2001G>А (M1) и с.4539+2028С>Т (M2) к нарушению сплайсинга пре-мРНК *ABCA4*,

получали клеточные линии фибробластов от двух неродственных пациентов с болезнью Штаргардта (STGD1). Пациент с STGD1 с M1 имел миссенс-вариант с.4892T>C (p.Leu1631Pro) в транс-ориентации (Webster et al., 2001). Пациент с STGD1 с M2 имел вариант в глубине интрона с.302+68C>T в цис-ориентации, в то время как делеция с.6148-698\_6670delinsTGTGACACCTCCCTAG (p.?) присутствовала на другом аллеле. Кроме того, получали линию фибробластов от здорового контроля. Все клетки культивировали в отсутствие и присутствии циклогексимида (CHX), соединения, которое обычно используют для подавления нонсенс-опосредованного разрушения продуктов РНК, несущих мутации, укорачивающие белок. Анализ ОТ-ПЦР с праймерами, расположенными в экзонах 30 и 31, выявил только чистый продукт, соответствующий ожидаемому продукту с экзонами 30 и 31 (фигура 4). Никаких продуктов с нарушениями сплайсинга не было выявлено в фибробластах от пациентов с STGD1.

Для исследования потенциально специфических для сетчатки дефектов сплайсинга, которые вызваны двумя мутациями ABCA4 глубоко в интроне, контрольные фибробласты и фибробласты пациентов были перепрограммированы в индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (iPSC) при помощи лентивирусной трансдукции факторами Яманаки (Takahashi et al., 2006). Количественная ПЦР (q-ПЦР) (фигура 7) и иммунофлуоресцентный анализ (данные не показаны) подтвердили плюрипотентность iPSC. Затем, эти iPSCs дифференцировали в течение одного месяца в клетки-предшественники фоторецепторов (RPCs). Мы использовали протокол, описанный ранее Flamier и коллегами (Flamier et al. 2016), для получения относительно гомогенной популяции колбочковых клеток, поскольку клетки, которые в первую очередь поражаются при STGD1, представляют собой колбочковые фоторецепторные клетки. Характеристика RPC, полученных от контроля и пациентов, выявила значимо повышенную экспрессию ABCA4, которая была приблизительно в 40 раз выше у RPC, чем у контрольных iPSC, но только приблизительно в три раза выше у M1- и M2-RPC по сравнению с M1- и M2-iPSC. Дополнительная характеристика RPC выявила, что все три клеточных линии

дифференцировали в направлении S-колбочек, хотя контрольные РРС экспрессировали более высокие количества CRX и OPN1SW по сравнению с M1- и M2-РРС (фигура 7B).

Поскольку AVCA4 сильно экспрессировался в РРС, мы провели анализ RT-ПЦР от экзона 30 до экзона 31, который показал неправильные транскрипты и в M1- и в M2-полученных РРС после обработки СНХ, но не в контрольных РРС (фигура 4A). Полуколичественная оценка соотношения между правильными и неправильными вариантами сплайсинга в образцах, обработанных СНХ, выявила, что ~25% транскриптов AVCA4 у пациента с M1 и ~15% транскриптов AVCA4 у пациента с M2 были с нарушениями (фигура 4B). Более детальный анализ всех полос путем секвенирования по Сэнгеру выявил ПЭ размером 345 н., содержащий преждевременный стоп-кодон (фигура 5), который по прогнозу приводит к укороченному белковому продукту p.Arg1514Leufs\*36. Интересно то, что, оба варианта включают одинаковый ПЭ в транскрипт мРНК после обработки СНХ. После того как была идентифицирована последовательность, мы изучили влияние обоих вариантов на сплайсинг. В соответствии со всеми предсказаниями при помощи программы, ни M1, ни M2 не изменяют силу сайта акцептора или донора сплайсинга (фигура 5). Сайт донора сплайсинга для ПЭ размером 345 н. содержит в качестве канонической последовательности сайта сплайсинга «GC», которая распознается только программой Splice-Site-Finder-Like (SSFL). Дальнейшие предсказания *in silico* показали, что M1 увеличивает силу сайта экзонного энхансера сплайсинга SF2 и создает новый мотив SRp55, в то время как M2 создает один мотив SC35 и два мотива SRp40 (фигура 5).

Дальнейший углубленный анализ всех полос, полученных при ОТ-ПЦР, выявил, что одна полоса содержит гетеродуплексы правильно сплайсированного транскрипта вместе с одним из транскриптов с ПЭ (фигура 4). Кроме того, очень слабая полоса, у которой отсутствовали последние 73 п.н. экзона 30, была обнаружена во всех образцах, обработанных СНХ, включая контроль. Этот альтернативный транскрипт, который также был выявлен в

полосе гетеродуплекса (фигура 4), объясняется относительно слабым сайтом донора сплайсинга (оценка Human Splicing Finder (HSF): 75,9). Этот продукт сплайсинга (r.4467\_4539del, p.Cys1490Glufs\*12) был также выявлен как результат вариантов сайта неканонического сплайсинга в «природном» донорском сайте сплайсинга экзона 30 (R. Sangermano, M. Khan et al. 2018). Интересно, что этот новый сайт донора был ранее описан как сайт акцептора сплайсинга (оценка HSF: 89,6), создающий изоформу без первых 114 п.н. экзона 30 (Gerber et al., 1998).

В семи случаях STGD1 с M2, в которых это было исследовано, с.302+68C>T была обнаружена в цис-ориентации (R. Allikmets, неопубликованные данные; Braun et al., 2013; Lee et al., 2016 и Zernant et al., 2014). Для того чтобы изучить вклад этого варианта в патологию STGD1, мы провели ОТ-ПЦР мРНК из контрольных РРС, M1-и M2-РРС, обработанных и необработанных СНХ, а также из мРНК сетчатки взрослого человека. Как показано на фигуре 8, праймеры ПЦР, расположенные в экзонах 2 и 5, производили продукт канонического сплайсинга размером 459 н., а также меньший фрагмент размером 317 н. во всех РРС и сетчатке человека. Подтверждение полос секвенированием по Сэнгеру выявило, что в 317-н. фрагменте отсутствовал экзон 3 (размер: 142 п.н.). Никаких других продуктов сплайсинга не наблюдали, что указывает на то, что вариант с.302+68C>T не приводит к активации крипточеских сайтов сплайсинга и/или экзонным энхансерам сплайсинга.

Как только был выяснен механизм, связанный с вариантами M1 и M2, нашей целью стала разработка терапевтического подхода, основанного на регуляции сплайсинга, для пропуска ПЭ. Привлекательным и эффективным способом являлось применение АОН, малых молекул РНК, которые способны проникать в клетку, связываться с пре-мРНК и модифицировать рисунок сплайсинга. Для того чтобы повысить их аффинность связывания и избежать активации РНКазы H (и, таким образом, разрушения транскрипта), мы использовали 2-О-метил-модифицированные РНК АОН с тиофосфатными (2OMe/PS) остовами, описанными ранее (Collin et

al., 2012; Garanto et al., 2016; Gerard et al., 2012 и Slijkerman et al., 2016). В целом, мы сконструировали четыре АОНа: два, для того чтобы заблокировать мотив SC35 с наивысшей оценкой, расположенный на 3'-конце ПЭ (АОН2, АОН3), один для того чтобы заблокировать второй по оценке SC35 на 5'-конце ПЭ (АОН4), и один для того чтобы заблокировать свежееобразованный мотив SRp55, связанный с M1 (АОН1; фигура 6А). Кроме того, для этой же области был сконструирован смысловой олигонуклеотид (SON), комплементарный АОН1 и содержащий такие же химические модификации, как и другие АОНЫ, но не способный связываться с пре-мРНК. АОНЫ и SON доставляли к РРС после месяца дифференцировки и анализировали РНК через 48 часов. Как и ожидалось, обработка СНХ увеличивала присутствие неправильно сплайсированных транскриптов в клетках без лечения (фигуры 6В и 6С). Кроме того, не было различий между нелечеными клетками и клетками, обработанными SON. Мы продемонстрировали, что АОНЫ эффективны для пропуска экзонов. Мы обнаружили, что АОН4 был способен эффективно производить до ~75% пропуска ПЭ в обеих клеточных линиях при двух различных концентрациях (фигура 6D), в то время как АОН1 был очень эффективен на клеточной линии с M1. АОН2 показал меняющуюся эффективность, в то время как АОН3 был способен перенаправлять сплайсинг и при 0,5 мкМ, и при 1 мкМ (фигуры 6В, 6С и 6D). Одним из объяснений для АОН2 и АОН3, показывающих такое различное поведение, несмотря на нацеливания на одну область, могли бы быть свойства АОН (Таблица 1, Таблица 2). АОН3 по сравнению с АОН2 имеет более низкое содержание GC и Tm, что может влиять на стабильность и связывающую способность, таким образом, объясняя низкую эффективность.

Для того чтобы дополнительно расширить наш поиск наиболее мощных АОН для перенаправления дефектов сплайсинга, вызванных мутацией с.4539+2001G>A, мы сконструировали и исследовали 22 дополнительных АОНа (АОН5-АОН26, SEQ ID NO:: 196, 199, 202, 205, 208, 211, 214, 217, 220, 223, 226, 229, 232, 235, 238, 241, 244, 247, 250, 253 и 256, соответственно), и оценили их способность перенаправлять сплайсинг ABCA4, предупреждая включение



псевдоэкзона размером 345 н.. Ранее исследованные АОНЫ 1-4 (SEQ ID NO: 35/184, 38/187, 41/190 и 44/193, соответственно) брали отдельно, а также два смысловых олигонуклеотида (SON1 [SEQ ID NO: 280] и SON2 [SEQ ID NO: 281]). Результаты показаны на фигуре 9. Помимо АОН 1 и 4, другие эффективные АОНЫ включали АОН9, АОН10, АОН14, АОН17, АОН18, АОН22, АОН23 и АОН24. Умеренно эффективные АОНЫ включали АОН2, АОН8, АОН11, АОН13, АОН16, АОН20 и АОН21. Слабоэффективные или неэффективные АОНЫ включали АОН3, АОН5, АОН6, АОН7, АОН12, АОН15, АОН19, АОН25 и АОН26. При сравнении свойств этих АОН стал очевидным ряд вещей:

i) АОНЫ, нацеленные на области вне псевдоэкзона (АОН5, АОН6, АОН7, АОН25 и АОН26) не способны перенаправлять сплайсинг АВСА4.

ii) АОНЫ, которые имели единичное нарушение комплементарности со своей мишенью, были неэффективными, т.е. АОН1 является специфичным для мутации с.4539+2001G>A, и не перенаправляет сплайсинг у пациента с мутацией с.4539+2028C>T (фигура 6D). Аналогично, АОН15 является специфичным для псевдоэкзона с мутацией с.4539+2028C>T и не эффективен для коррекции дефектов сплайсинга, вызванных мутацией с.4539+2001G>A (фигура 9).

iii) АОНЫ, которые эффективны для перенаправления сплайсинга, часто содержат мотив SC35 (и эффективные, и умеренно эффективные имеют в среднем в 1,8 и 1,45 раз больше мотивов SC35 по сравнению со слабоэффективными и неэффективными АОНами). Не наблюдали значительных различий для мотивов SF2 и SRp40. Для умеренно эффективных АОНов, мы выявили обогащение мотивами SRp55 в 4 и 2,6 раз по сравнению с эффективными и с группой слабоэффективных и неэффективных АОНов, соответственно).

iv) В среднем, не было различий по длине АОН, между теми, которые перенаправляли сплайсинг и которые не перенаправляли. Однако, мы все обнаружили, что температура плавления ( $T_m$ ) была в среднем на 2 и 3 градуса выше у эффективных АОНов, при сравнении с умеренно эффективной группой и группой, состоящей из слабоэффективных и неэффективных АОНов.

v) Также в среднем и эффективные, и умеренно эффективные АОНЫ показали процентное содержание GC выше 54%, в то время как в среднем у слабоэффективных или неэффективных АОНов было ниже 48%.

vi) Мы не наблюдали явных различий между АОНами, которые связывались с предсказанными смешанными областями с частично открытыми и частично открытыми областями, и АОНами, которые связывались или с закрытыми или с открытыми областями.

D) Мидигенными конструкциями с мутацией с.769-784C>T, с.859-540C>G, с.859-506G>C, с.1937+435C>G, с.4539+1100A>G, с.4539+1106C>T или с.5197-557G>T трансфицировали клетки НЕК293Т вместе с конструкцией с соответствующими последовательностями *AVSA4* дикого типа. Как показано на фигуре 10, все мутации в различной степени приводят к вставке псевдоэкзона различной длины (дорожки, обозначенные NT). Трансфекция тремя различными АОНами, а также одним общим SON для каждой мутации, показала, что для всех мутаций, по меньшей мере, один АОН был эффективен для спасения от вставки псевдоэкзона, связанной с этой мутацией. Конкретно, для с.769-784C>T, добавление АОН1 и АОН2 приводит к снижению вставки псевдоэкзона, в то время как АОН3 частично исправляет дефект сплайсинга. Для с.859-540C>G, АОН1 не эффективен, АОН2 очень эффективен, в то время как АОН3 частично исправляет дефект сплайсинга. Однако, во время финальной проверки, мы обнаружили, что АОН1, который был разработан для мутации с.859-540C>G, был заказан неправильно, и вместо него была заказана и получена последовательность АОН3 для мутации с.5197-557G>T. Это также повлияло на интерпретацию результатов. Таким образом, отрицательный результат, полученный для АОН1, является ожидаемым, поскольку фактический использованный АОН не специфичен для соответствующего псевдоэкзона, и, таким образом, не должен работать. Для с.859-506G>C, АОН1 и АОН3 привели к снижению содержания транскрипта с псевдоэкзоном, в то время как АОН2 был неэффективен. Для с.1937+435C>G, все три АОНа привели к уменьшению транскриптов *AVSA4* с псевдоэкзоном. Для мутаций

с.4539+1100A>G и с.4539+1106C>T, АОН1 и АОН2, по-видимому, были эффективны, в то время как АОН3 явно не был. Наконец, для мутации с.5197-557G>T, все три АОНа показали уменьшение транскриптов с псевдоэкзоном. Вместе эти данные демонстрируют способность АОНов перенаправлять события нарушенного сплайсинга, вызванные исследованными мутациями в глубине интрона *ABCA4*, по меньшей мере, с одним эффективным АОН для каждого псевдоэкзона.

#### **ОБСУЖДЕНИЕ**

В этом исследовании, мы показали, что два соседних варианта глубоко в интроне *ABCA4*, с.4539+2001G>A и с.4539+2028C>T, приводят к специфичному для сетчатки включению псевдоэкзона (ПЭ) размером 345 н. в части транскриптов *ABCA4*. Этот ПЭ, который по предсказанию приводит к укорочению белка (p.Arg1514Leufs\*36), был обнаружен в виде низкокопийной альтернативной формы сплайсинга *ABCA4* при проведении глубокого РНК-секвенирования для РНК желтого пятна человека (Braun et al, 2013). Количественная оценка продукта ОТ-ПЦР выявила больше вставок ПЭ из-за M1, чем из-за M2. На основании фенотипа глаз у пациентов STGD1 с M1, и характера вариантов, наблюдаемых в транс-ориентации у этих пациентов, предположили, что M1 действует как тяжелый вариант (Bauwens et al, 2015; Vax et al, 2015; Braun et al, 2013). Напротив, на основании наших собственных наблюдений и ограниченных клинических данных, доступных для некоторых пациентов с STGD1 с M2 (Lee et al, 2016), мы предположили, что M2 действует как вариант от мягкого до умеренно тяжелого. Мы, таким образом, могли бы ожидать, что количество мутантной мРНК у пациента с M1, миссенс-вариантом в транс-ориентации, должно быть равным количеству правильного продукта. Это не так, хотя трудно сравнивать, поскольку более маленькие продукты амплифицируются более эффективно и подавление путем NMD может быть неполным. Вставка ПЭ из-за M2 менее известна, чем для M1, что согласуется с ее менее серьезным характером. Однако, мы не можем исключить возможности, что другие *cis*-действующие варианты, упущенные во время секвенирования локусов, (Zernant et al, 2014) действуют согласованно с этими вариантами интрона 30. Кроме того, могут

играть роль специфические механизмы, связанные с типом клеток, поскольку обе линии РРС, полученные от пациентов были менее дифференцированные, чем контрольная линия РРС, указывая на возможность задержки в дифференцировке. Это может оказывать значительное влияние на количество вставок ПЭ. Ясный пример важности ретинальной дифференцировки для распознавания ПЭ был описан для варианта в глубине интрона с.2991+1655A>G в *CEP290*. В то время как лимфобластные и фибробластные клетки пациентов имели эту мутацию в гомозиготном виде, соотношение неправильно и правильно сплайсированного *CEP290* составляет ~1:1 (Collin et al, 2012; Garanto et al, 2016; den Hollander et al, 2006), было обнаружено что, в фоторецепторных клетках, полученных из iPSC количество неправильно сплайсированного *CEP290* резко возрастает (соотношение ~1:4; Parfitt et al, 2016). Это исследование не только раскрыло понимание того, почему эта мутация, несмотря на повсеместную экспрессию *CEP290*, приводит к несиндромному ретинальному фенотипу, но также продемонстрировало огромную силу использования ретинальных клеток, полученных из iPSC, от пациентов для изучения дефектов сплайсинга в подходящей клеточной системе.

Известные ранее интронные варианты, связанные с наследственными заболеваниями сетчатки (IRD), создавали новые сайты акцептора сплайсинга или донора сплайсинга, которые давали возможность вставки ПЭ (Braun et al, 2013; Bonifert et al, 2016; Webb et al, 2012; van den Hurk et al, 2003; Vache et al, 2012; Rio Frio et al, 2009; Naruto et al, 2015; Mayer et al, 2016; Liquori et al, 2016; den Hollander et al, 2006; Carss et al, 2017). Насколько нам известно, мы первые сообщаем о вставке ПЭ, которая не вызвана этим механизмом, а, вероятно, связана с образованием новых мотивов ESE при IRD. Интронные области пронизаны парами предсказанных сайтов акцептора и донора сплайсинга, которые теоретически могут фланкировать ПЭ. После выявления дополнительных ПЭ, которые не активируются путем создания сайтов сплайсинга, будет возможно определить последовательность мотивов, которые переводят криптоические ПЭ в

реальные ПЭ.

Вставки ПЭ, связанные с M1 и M2, были успешно блокированы несколькими АОН. M1-специфичный АОН был эффективен только на M1-клеточной линии, и даже в двойной концентрации АОН, АОН1 был все еще неспособен корректировать дефект сплайсинга на клеточной линии с M2. Кроме того, M2-специфичный АОН, который имел единичное нарушение комплементарности с последовательностью ПЭ, был неэффективен у пациента с M1. Эти результаты подчеркивают специфичность последовательности и тот факт, что несовпадения одного нуклеотида достаточно для изменения эффективности АОН. Заново созданный мотив SRp55 может играть важную роль в детекции ПЭ. Это еще предстоит выяснить, учитывая тот факт, что оба варианта активируют одинаковый ПЭ, и АОН4 способен пропустить ПЭ в обоих случаях. Одним из ограничений АОН является то, что они связываются со специфическими последовательностями и, таким образом, невозможно тестировать такой же АОН на модели на животных, если отсутствует консервативная область ДНК/РНК, за исключением того, если создана модель, в которую вставлена часть последовательности человека в ортологичном положении в геном животного. Однако, уже известно, что химия 2OMe/PS и 2MOE (2-O-Метоксиэтил)/PS не токсична для глаза, как показано на нескольких животных моделях (Garanto et al, 2016; Gerard et al, 2015; Murray et al, 2015). Кроме того, первый коммерческий АОН применяли для лечения заболевания глаз, CMV-ретинита (Fomivirsen approved for CMV retinitis: first antisense drug. *AIDS treatment news*, 7 (1998)). Таким образом, технология АОН выглядит безопасным и многообещающим подходом для лечения заболеваний глаз. Вследствие отсутствия моделей на животных, применение фоторецепторов, полученных из iPSC, по-видимому, является подходящей альтернативой, хотя все еще нужно выяснить, можно ли восстановить функцию белка ABCA4 белок после лечения этих клеток.

В заключение, с использованием полученных от пациента iPSC, дифференцированных в S-колбочки, мы смогли идентифицировать молекулярный дефект из-за двух рекуррентных соседних вариантов в глубине интрона, лежащих в основе STGD1. Дефект сплайсинга

состоял из вставки ПЭ размером 345, которая, по-видимому, является тканеспецифической, и, наиболее вероятно, вызвана наличием новообразованных экзонных энхансеров сплайсинга, а не связана с возникновением новых сайтов сплайсинга. Кроме того, был разработан и протестирован терапевтический подход на основе АОН, показывающий, что один АОН способен перенаправить сплайсинг в обеих мутированных клеточных линиях. Кроме того, вариант-специфический АОН был очень эффективен против М1, но не М2, что указывает на то, что единичный некоплементарный нуклеотид может резко изменить эффективность АОН. Для нескольких мутаций в глубине интрона *ABCA4* (т.е. с.769-784С>Т, с.859-540С>G, с.859-506G>С, с.1937+435С>G, с.4539+1100А>G, с.4539+1106С>Т или с.5197-557G>Т) мы показали, что все они приводят к вставке псевдоэкзона. Были сконструированы АОНЫ для блокирования вставки этого псевдоэкзона, и для каждого псевдоэкзона, по меньшей мере, один АОН был способен значительно снизить количество нарушенных транскриптов *ABCA4*. В целом, эти результаты подчеркивают потенциал АОН как терапевтического инструмента для болезни Штаргардта.

#### **Ссылки**

Aartsma-Rus, A. Overview on AON design. *Methods Mol. Biol.* 867, 117-129 (2012), doi:10.1007/978-1-61779-767-5\_8.

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., Hoyng, 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.

Bonifert, T., Gonzalez Menendez, I., Battke, F., Theurer, Y., Synofzik, M., Schols, L. & Wissinger, B. Antisense oligonucleotide mediated splice correction of a deep intronic mutation in OPA1. *Mol. Ther. Nucleic Acids* **5**, e390 (2016), doi:10.1038/mtna.2016.93.

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.

Chiorini, J.A., Kim, F., Yang, L., and Kotin, R.M. (1999). Cloning and characterization of adeno-associated virus type 5. *Journal of virology* **73**, 1309-1319.

Collin, R.W., den Hollander, A.I., van der Velde-Visser, S.D., Bennicelli, J., Bennett, J., and Cremers, F.P. (2012). Antisense Oligonucleotide (AON)-based Therapy for Leber Congenital Amaurosis Caused by a Frequent Mutation in CEP290. *Molecular therapy Nucleic acids* **1**, 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).

den Hollander, A. I., Koenekoop, R. K., Yzer, S., Lopez, I., Arends, M. L., Voesenek, K. E., Zonneveld, M. N., Strom, T. M., Meitinger, T., Brunner, H. G., Hoyng, C. B., van den Born, L. I., Rohrschneider, K. & Cremers, F. P. Mutations in the CEP290 (NPHP6) gene are a frequent cause of Leber congenital amaurosis. *Am. J. Hum. Genet.* **79**, 556-561 (2006).

Dorn, A., and Kippenberger, S. (2008). Clinical application of CpG-, non-CpG-, and antisense oligodeoxynucleotides as immunomodulators. *Current opinion in molecular therapeutics* *10*, 10-20.

Egholm, M., Buchardt, O., Christensen, L., Behrens, C., Freier, S.M., Driver, D.A., Berg, R.H., Kim, S.K., Norden, B., and Nielsen, P.E. (1993). PNA hybridizes to complementary oligonucleotides obeying the Watson-Crick hydrogen-bonding rules. *Nature* *365*, 566-568.

Flamier, A., Barabino, A. & Bernier, G. Differentiation of human embryonic stem cells into cone photoreceptors. *Bio-protocol* *6*, e1870 (2016), doi:10.21769/BioProtoc.1870

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, D.C., Duijkers, L., Corral-Serrano, J.C., Messchaert, M., Xiao, R., Bennett, J., Vandenberghe, L.H., and Collin, R.W. (2016). In vitro and in vivo rescue of aberrant splicing in CEP290-associated LCA by antisense oligonucleotide delivery. *Human molecular genetics* *25*, 2552-2563.

Gerard, X., Perrault, I., Hanein, S., Silva, E., Bigot, K., Defoort-Delhemmes, S., Rio, M., Munnich, A., Scherman, D., Kaplan, J., Kichler, A. & Rozet, J. M. AON-mediated exon skipping restores ciliation in fibroblasts harboring the common Leber congenital amaurosis CEP290 mutation. *Mol. Ther. Nucleic Acids* *1*, e29 (2012), doi:10.1038/mtna.2012.21

Gerard, X., Perrault, I., Munnich, A., Kaplan, J. & Rozet,



J. M. Intravitreal injection of splice-switching oligonucleotides to manipulate splicing in retinal cells. *Mol. Ther. Nucleic Acids* **4**, e250 (2015), doi:10.1038/mtna.2015.24.

Gerber, S., Rozet, J. M., van de Pol, T. J., Hoyng, C. B., Munnich, A., Blankenagel, A., Kaplan, J. & Cremers, F. P. M. Complete exon-intron structure of the retina-specific ATP binding transporter gene (ABCR) allows the identification of novel mutations underlying Stargardt disease. *Genomics* **48**, 139-142 (1998), doi:10.1006/geno.1997.5164.

Gorman, L., Suter, D., Emerick, V., Schumperli, D., and Kole, R. (1998). Stable alteration of pre-mRNA splicing patterns by modified U7 small nuclear RNAs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**, 4929-4934.

Govindaraju, T., and Kumar, V.A. (2005). Backbone-extended pyrrolidine peptide nucleic acids (bepPNA): design, synthesis and DNA/RNA binding studies. *Chemical communications*, 495-497.

Lee, W., Xie, Y., Zernant, J., Yuan, B., Bearely, S., Tsang, S. H., Lupski, J. R. & Allikmets, R. Complex inheritance of ABCA4 disease: four mutations in a family with multiple macular phenotypes. *Hum. Genet.* **135**, 9-19 (2016), doi:10.1007/s00439-015-1605-y.

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.

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.

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.

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).

Morita, K., Hasegawa, C., Kaneko, M., Tsutsumi, S., Sone, J., Ishikawa, T., Imanishi, T., and Koizumi, M. (2001). 2'-O,4'-C-ethylene-bridged nucleic acids (ENA) with nuclease-resistance and high affinity for RNA. *Nucleic acids research Supplement*, 241-242.

Murray, S. F., Jazayeri, A., Matthes, M. T., Yasumura, D., Yang, H., Peralta, R., Watt, A., Freier, S., Hung, G., Adamson, P. S., Guo, S., Monia, B. P., LaVail, M. M. & McCaleb, M. L. Allele-specific inhibition of rhodopsin with an antisense oligonucleotide slows photoreceptor cell degeneration. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **56**, 6362-6375 (2015), doi:10.1167/iovs.15-16400.

Naruto, T., Okamoto, N., Masuda, K., Endo, T., Hatsukawa, Y., Kohmoto, T. & Imoto, I. Deep intronic GPR143 mutation in a Japanese family with ocular albinism. *Sci. Rep.* **5**, 11334 (2015), doi:10.1038/srep11334.

Nielsen, P.E., Egholm, M., Berg, R.H., and Buchardt, O. (1991). Sequence-selective recognition of DNA by strand displacement with a thymine-substituted polyamide. *Science* **254**, 1497-1500.

Parfitt, D. A., Lane, A., Ramsden, C. M., Carr, A. J., Munro, P. M., Jovanovic, K., Schwarz, N., Kanuga, N., Muthiah, M. N., Hull, S., Gallo, J. M., da Cruz, L., Moore, A. T., Hardcastle, A. J., Coffey, P. J. & Cheetham, M. E. Identification and correction of mechanisms underlying inherited blindness in human iPSC-derived optic cups. *Cell stem Cell* **18**, 769-781 (2016), doi:10.1016/j.stem.2016.03.021.

Rio Frio, T., McGee, T. L., Wade, N. M., Iseli, C., Beckmann, J. S., Berson, E. L. & Rivolta, C. A single-base substitution within an intronic repetitive element causes dominant retinitis pigmentosa with reduced penetrance. *Hum. Mutat.* **30**, 1340-1347 (2009), doi:10.1002/humu.21071.

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, N.M., Bauwens, M., van den Born, L.I., De Baere, E., Garanto, A., Collin, R.W., Goercharn-Ramlal, A.S., den Engelsman-van Dijk, A.H., Rohrschneider, K., et al. (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, Elmelik D, Garanto A, Qamar R, Lugtenberg D, van den Born LI, Collin RWJ, Cremers FPM. *Genome Res* (2018), epub ahead of print, doi: 10.1101/gr.226621.117.

Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., Tinevez, J. Y., White, D. J., Hartenstein, V., Eliceiri, K., Tomancak, P. & Cardona, A. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat. Methods* **9**, 676-682 (2012), doi:10.1038/nmeth.2019.

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.

Takahashi, K. & Yamanaka, S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by

defined factors. *Cell* 126, 663-676 (2006), doi:10.1016/j.cell.2006.07.024

Vache, C., Besnard, T., le Berre, P., Garcia-Garcia, G., Baux, D., Larrieu, L., Abadie, C., Blanchet, C., Bolz, H. J., Millan, J., Hamel, C., Malcolm, S., Claustres, M. & Roux, A. F. Usher syndrome type 2 caused by activation of an USH2A pseudoexon: implications for diagnosis and therapy. *Hum. Mutat.* **33**, 104-108 (2012), doi:10.1002/humu.21634.

van den Hurk, J. A., van de Pol, D. J., Wissinger, B., van Driel, M. A., Hoefsloot, L. H., de Wijs, I. J., van den Born, L. I., Heckenlively, J. R., Brunner, H. G., Zrenner, E., Ropers, H. H. & Cremers, F. P. M. Novel types of mutation in the choroideremia (CHM) gene: a full-length L1 insertion and an intronic mutation activating a cryptic exon. *Hum. Genet.* **113**, 268-275 (2003), doi:10.1007/s00439-003-0970-0.

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).

Webb, T. R., Parfitt, D. A., Gardner, J. C., Martinez, A., Bevilacqua, D., Davidson, A. E., Zito, I., Thiselton, D. L., Ressa, J. H., Apergi, M., Schwarz, N., Kanuga, N., Michaelides, M., Cheetham, M. E., Gorin, M. B. & Hardcastle, A. J. Deep intronic mutation in OFD1, identified by targeted genomic next-generation sequencing, causes a severe form of X-linked retinitis pigmentosa (RP23). *Hum. Mol. Genet.* **21**, 3647-3654 (2012), doi:10.1093/hmg/ddc194.

Webster, A. R., Heon, E., Lotery, A. J., Vandeburgh, 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. Ophthalm. 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.

Fomivirsen approved for CMV retinitis: first antisense drug. *AIDS treatment news*, **7** (1998).

**ИЗМЕНЕННАЯ ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ**

1. Антисмысловой олигонуклеотид для перенаправления сплайсинга, который:

- комплементарен или по существу комплементарен полинуклеотиду с нуклеотидной последовательностью, состоящей из SEQ ID NO: 81 или его части.

2. Антисмысловой олигонуклеотид для перенаправления сплайсинга по п. 1, где антисмысловой олигонуклеотид для перенаправления сплайсинга содержит 2'-O алкилтиофосфатный антисмысловой олигонуклеотид, такой как 2'-O-метил модифицированная рибоза (РНК), 2'-O-этил модифицированная рибоза, 2'-O-пропил модифицированная рибоза, и/или замещенные производные этих модификаций, такие как галогенированные производные.

3. Антисмысловой олигонуклеотид для перенаправления сплайсинга по любому из предшествующих пунктов, где часть, которая комплементарна или по существу комплементарна полинуклеотиду с нуклеотидной последовательностью, состоящей из SEQ ID NO: 10 или 30, имеет длину приблизительно от 8 до приблизительно 40 нуклеотидов, предпочтительно приблизительно от 10 до приблизительно 40 нуклеотидов, более предпочтительно приблизительно от 14 до приблизительно 30 нуклеотидов, более предпочтительно приблизительно от 16 до приблизительно 24 нуклеотидов, а именно, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 или 24 нуклеотида.

4. Антисмысловой олигонуклеотид для перенаправления сплайсинга по любому из предшествующих пунктов, который имеет длину приблизительно от 8 до приблизительно 100 нуклеотидов, предпочтительно приблизительно от 10 до приблизительно 40 нуклеотидов, более предпочтительно приблизительно от 14 до приблизительно 30 нуклеотидов, более предпочтительно приблизительно от 16 до приблизительно 24 нуклеотидов, а именно 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 или 24 нуклеотида.

5. Антисмысловой олигонуклеотид для перенаправления сплайсинга по любому из предшествующих пунктов, где указанный антисмысловой олигонуклеотид содержит или включает

последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 85, 88 и 91.

6. Антисмысловой олигонуклеотид для перенаправления сплайсинга по п. 1, содержащий по меньшей мере один рибонуклеотид.

7. Антисмысловой олигонуклеотид для перенаправления сплайсинга по п. 1, содержащий по меньшей мере один мотив ESE (экзонного энхансера сплайсинга).

8. Вирусный вектор, экспрессирующий антисмысловой олигонуклеотид для перенаправления сплайсинга по любому из предшествующих пунктов, в условиях, способствующих экспрессии антисмыслового олигонуклеотида для пропуска экзона.

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

10. Фармацевтическая композиция по п. 9, где фармацевтическая композиция предназначена для интравитреального введения и ее дозируют в количестве в диапазоне от 0,05 мг до 5 мг общего количества антисмысловых олигонуклеотидов для перенаправления сплайсинга на глаз.

11. Фармацевтическая композиция по п. 10, где фармацевтическая композиция предназначена для интравитреального введения и ее дозируют в количестве в диапазоне от 0,1 до 1 мг общего количества антисмысловых олигонуклеотидов для перенаправления сплайсинга на глаз, а именно, приблизительно 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9 или 1,0 мг общего количества антисмысловых олигонуклеотидов для перенаправления сплайсинга на глаз.

12. Применение антисмыслового олигонуклеотида для перенаправления сплайсинга по любому из пп. 1-7, вектора по п. 8 или композиции по любому из пп. 9-11 для получения лекарственного средства для лечения заболевания или состояния, связанного с ABCA4 и требующего регуляции сплайсинга ABCA4.

13. Применение антисмыслового олигонуклеотида для

перенаправления сплайсинга по любому из пп. 1-7, вектора по п. 8 или композиции по любому из пп. 9-11 для лечения заболевания или состояния, связанного с ABCA4 и требующего регуляции сплайсинга ABCA4.

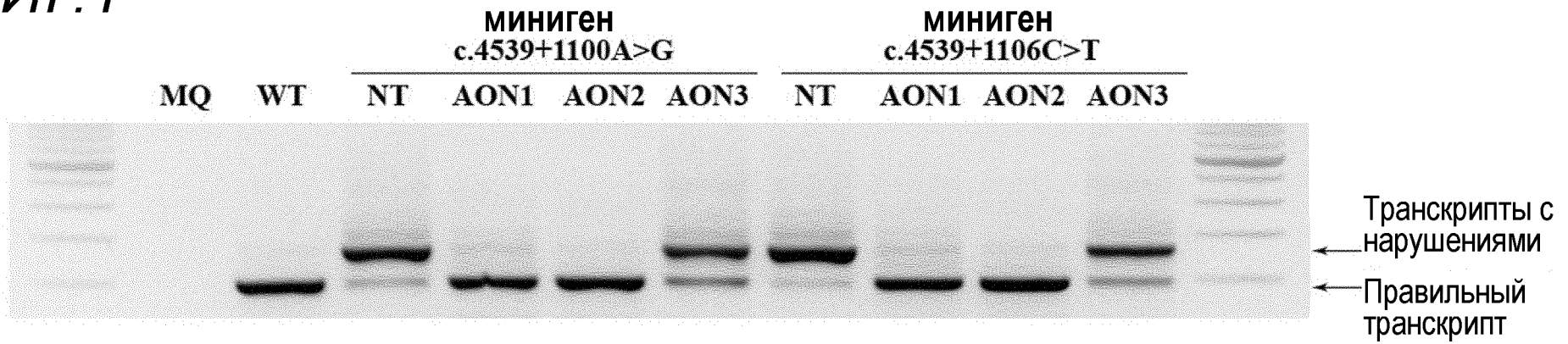
14. Способ регуляции сплайсинга ABCA4 в клетке, указанный способ включает контакт указанной клетки с антисмысловым олигонуклеотидом для перенаправления сплайсинга, определенным по любому из пп. 1-7, с вектором по п. 8 или композицией по любому из пп. 9-11.

15. Способ для лечения заболевания или состояния, связанного с ABCA4 и требующего регуляции сплайсинга ABCA4, у нуждающегося в этом индивидуума, при этом указанный способ включает контакт клетки указанного индивидуума с антисмысловым олигонуклеотидом для перенаправления сплайсинга, определенного по любому из пп. 1-7, вектором по п. 8 или композицией по любому из пп. 9-11, предпочтительно, где заболевание или состояние, связанное с ABCA4, представляет собой болезнь Штаргардта.

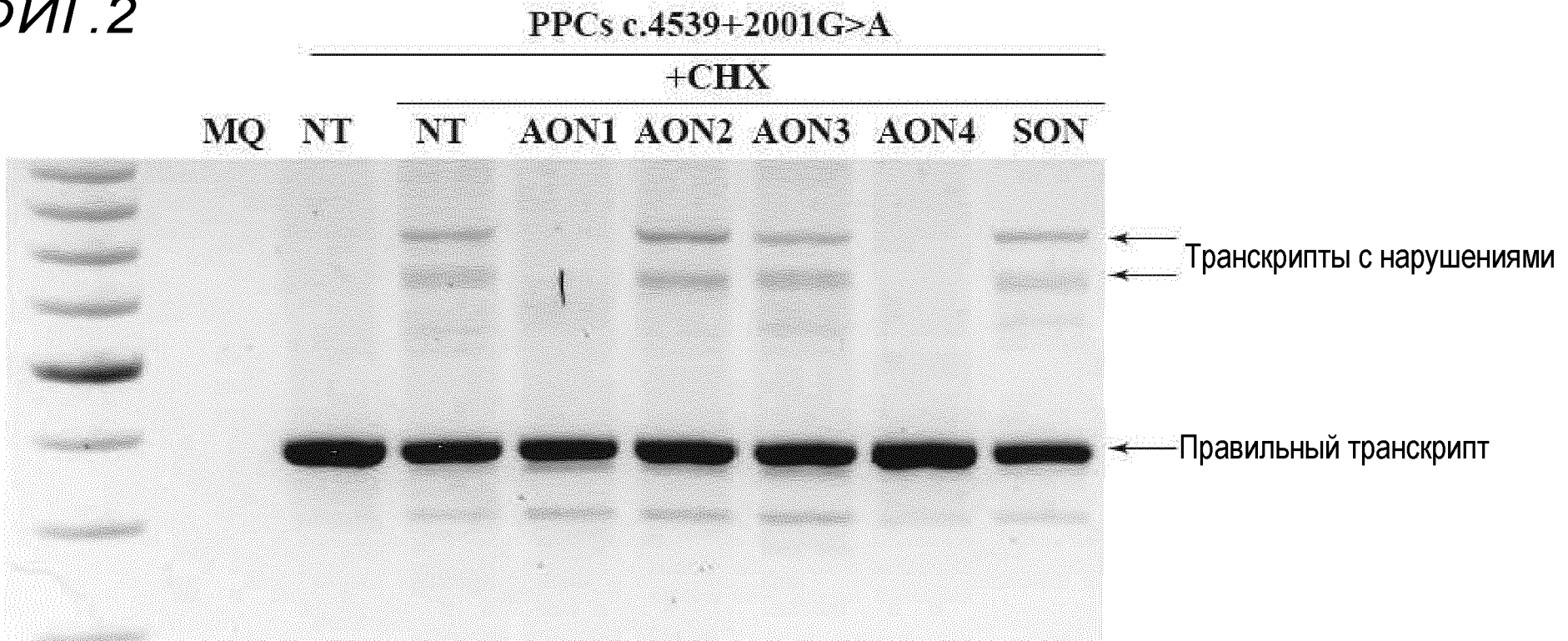
По доверенности



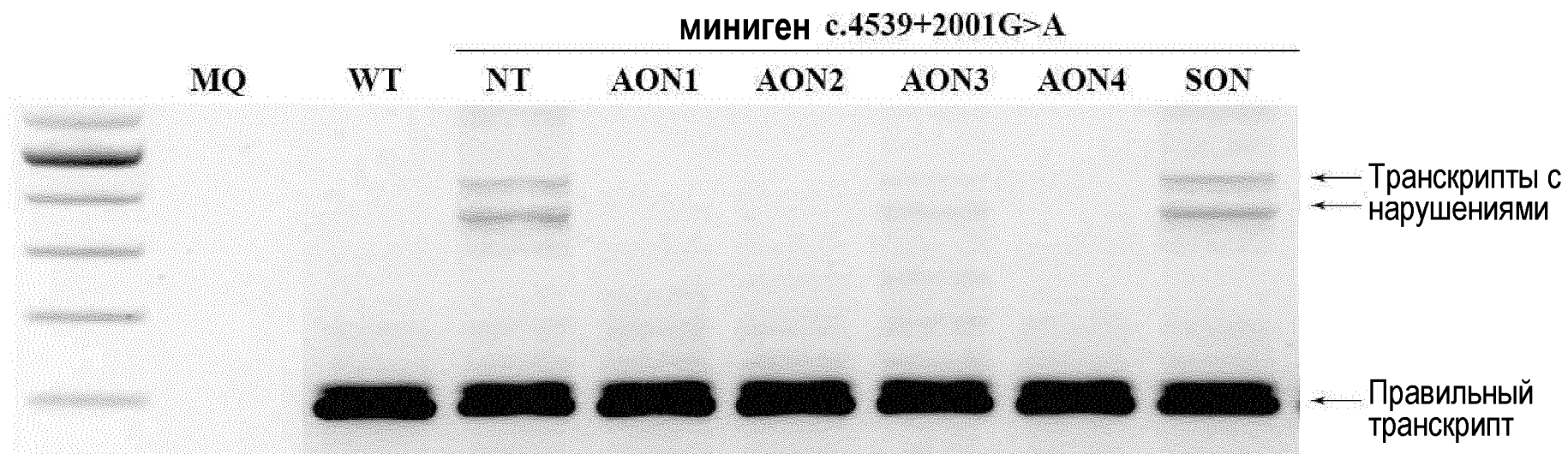
ФИГ.1



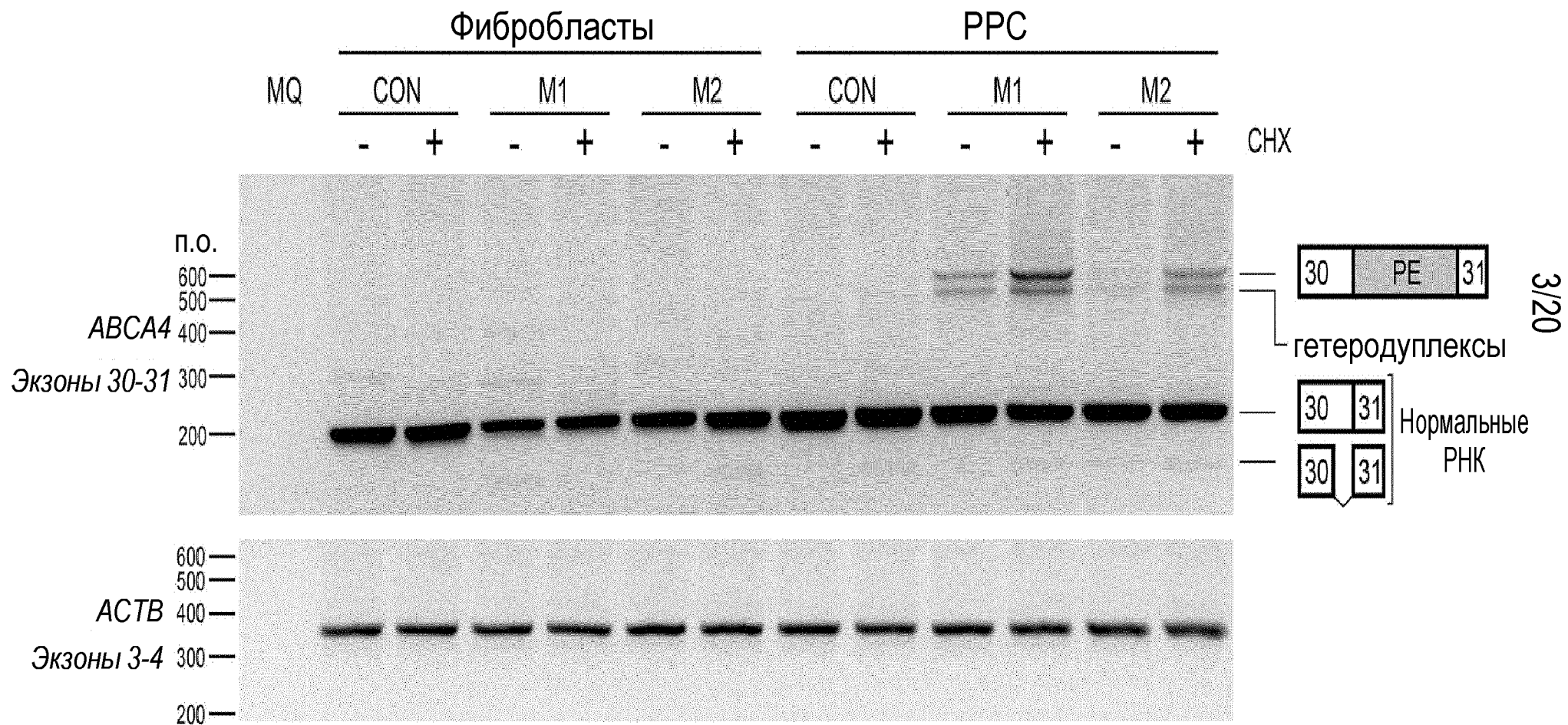
ФИГ.2



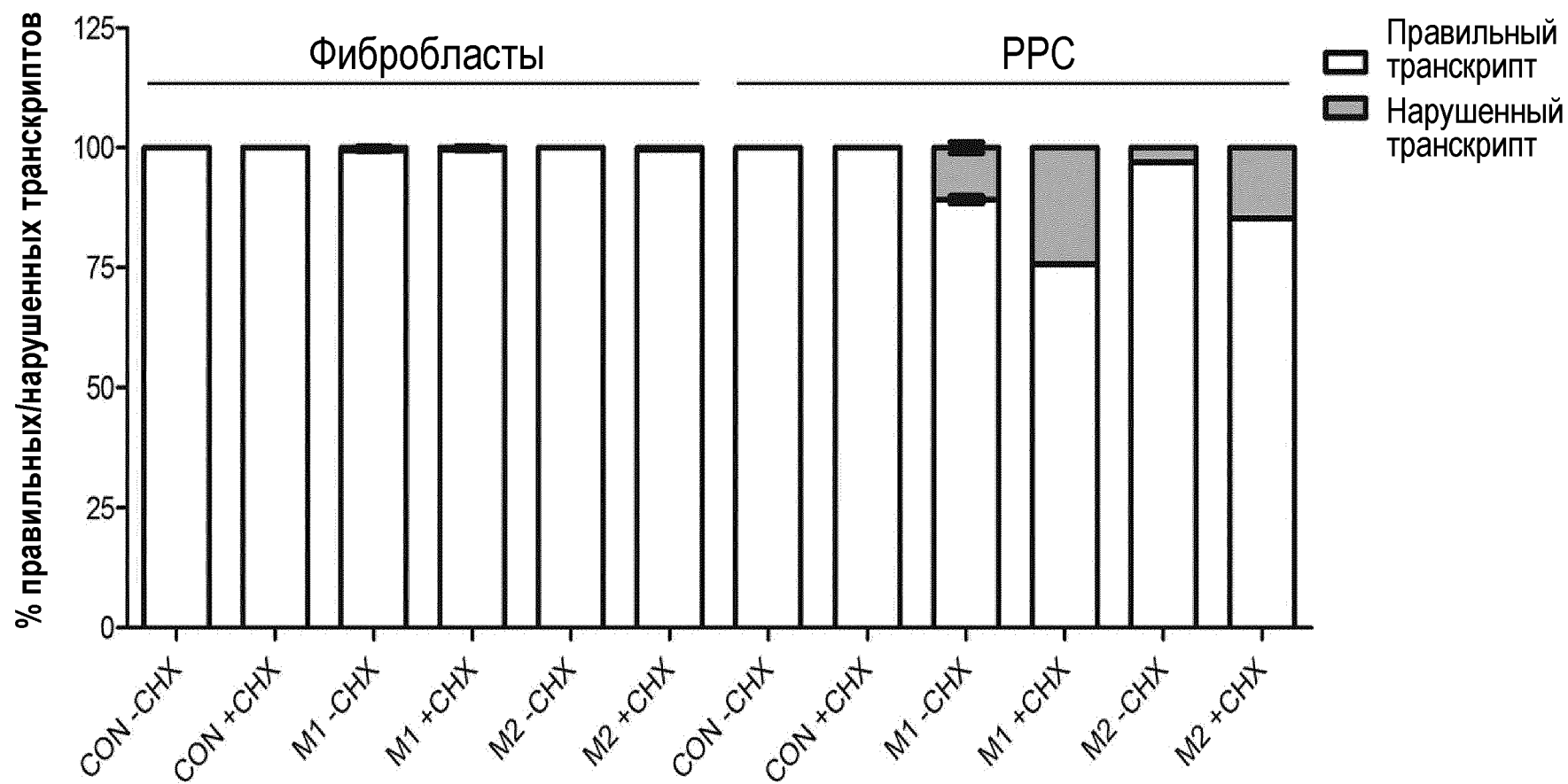
ФИГ.3



ФИГ.4А

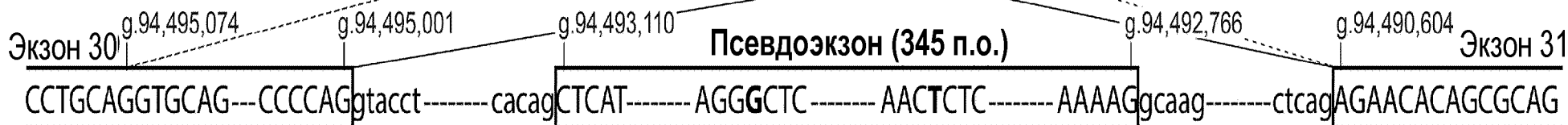


ФИГ.4В



# ФИГ.5

## Нормальный сплайсинг



## Нарушенный сплайсинг

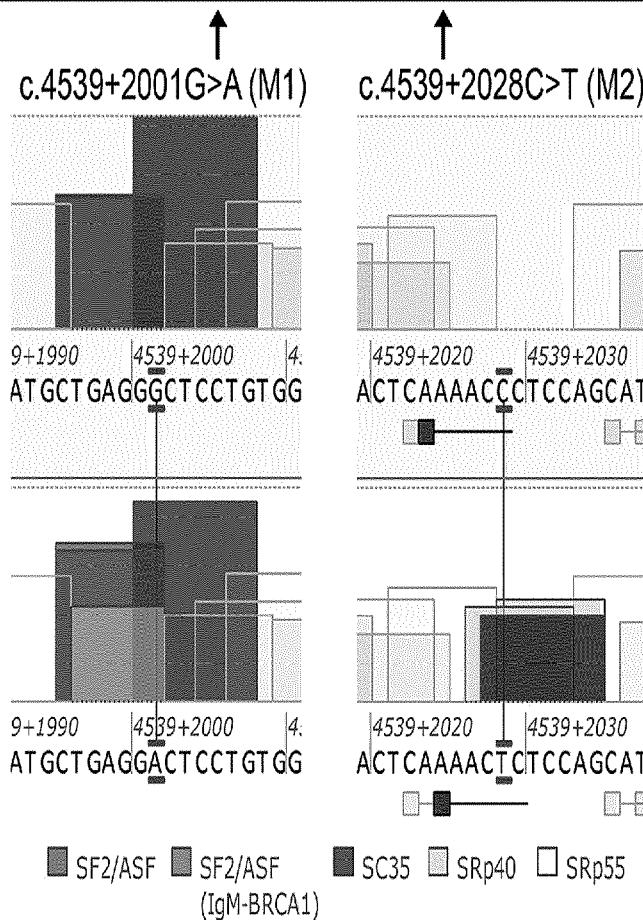
### Контроль

SSFL 82.1  
HSF 85.5

### M1 или M2

SSFL 82.1  
HSF 85.5

## Сайт акцептора сплайсинга



### Контроль

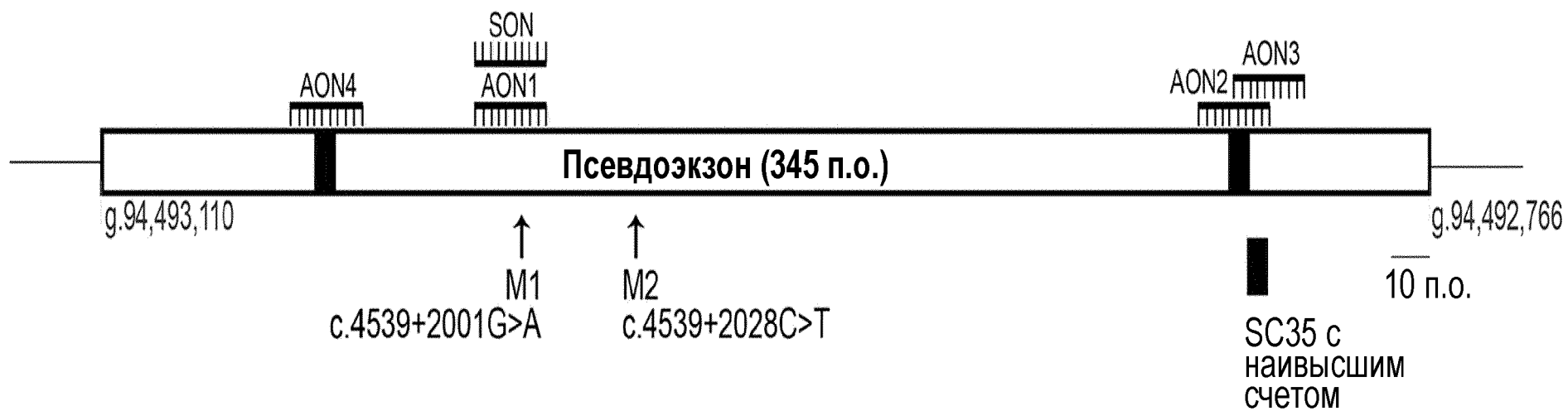
91.6  
nd

### M1 или M2

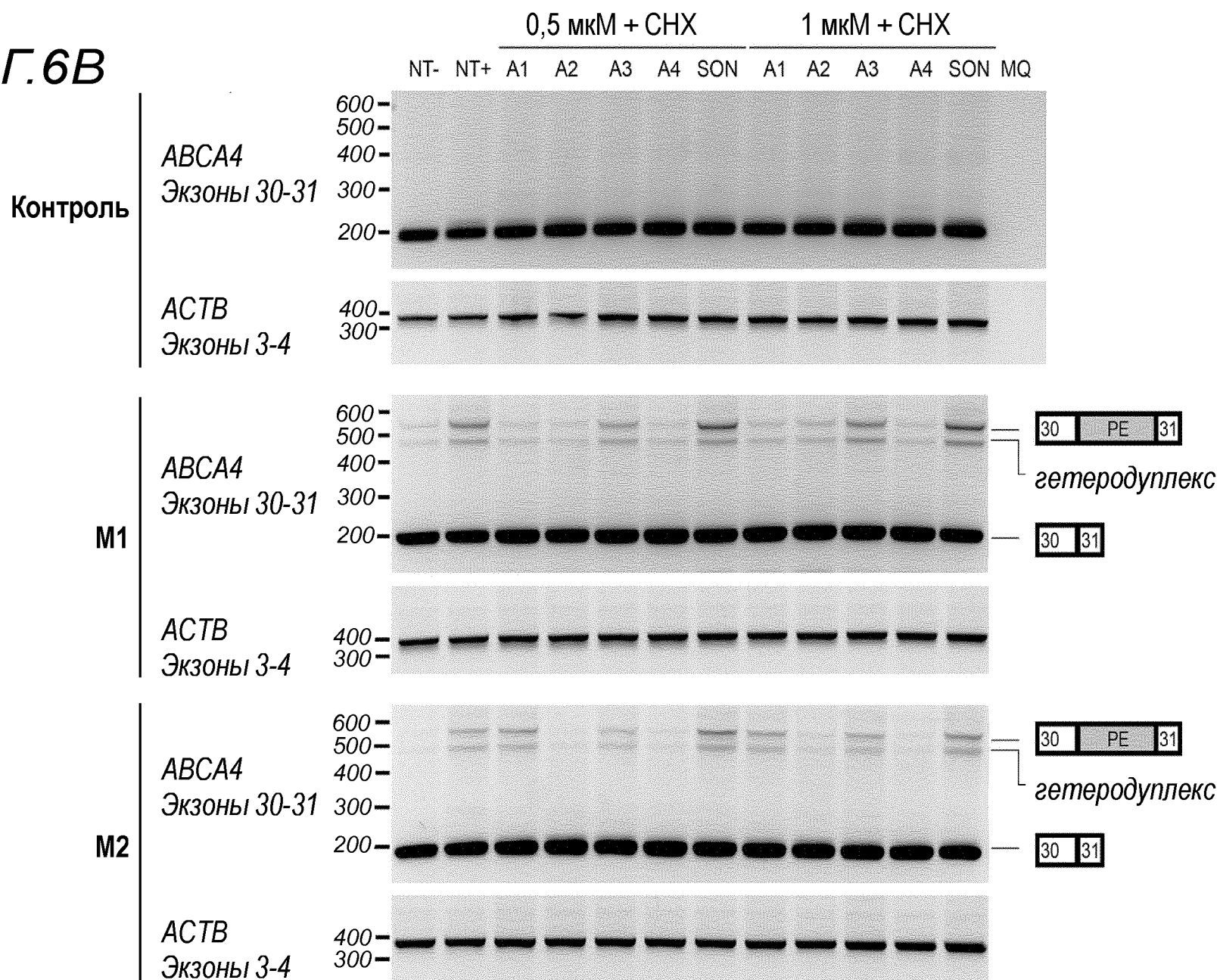
91.6  
nd

## Сайт донора сплайсинга

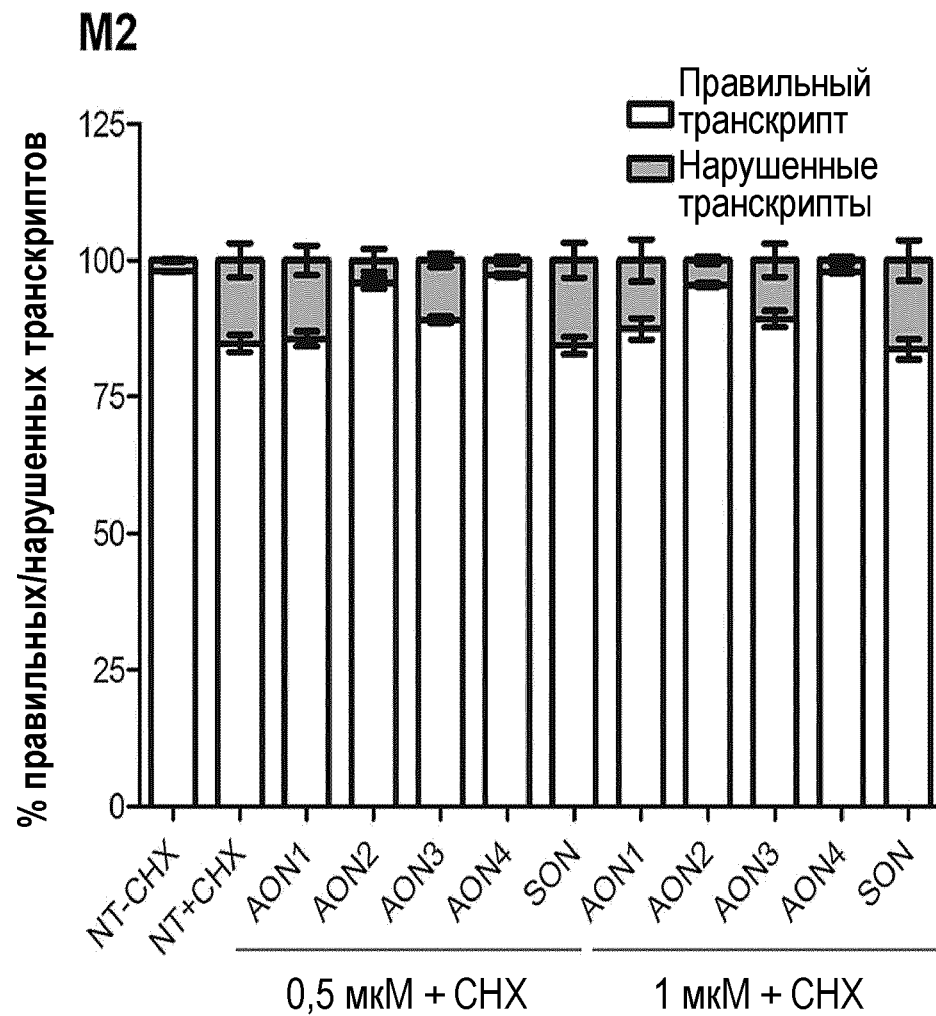
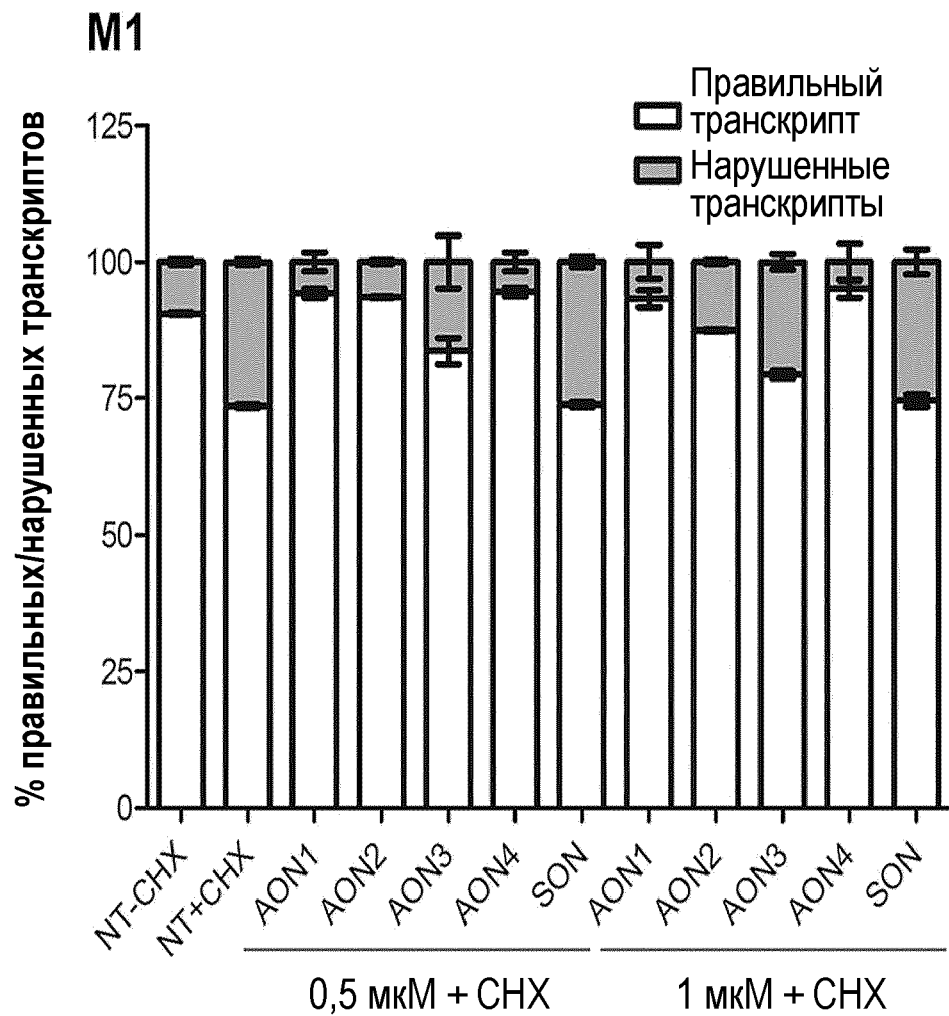
ФИГ.6А



**ФИГ.6В**

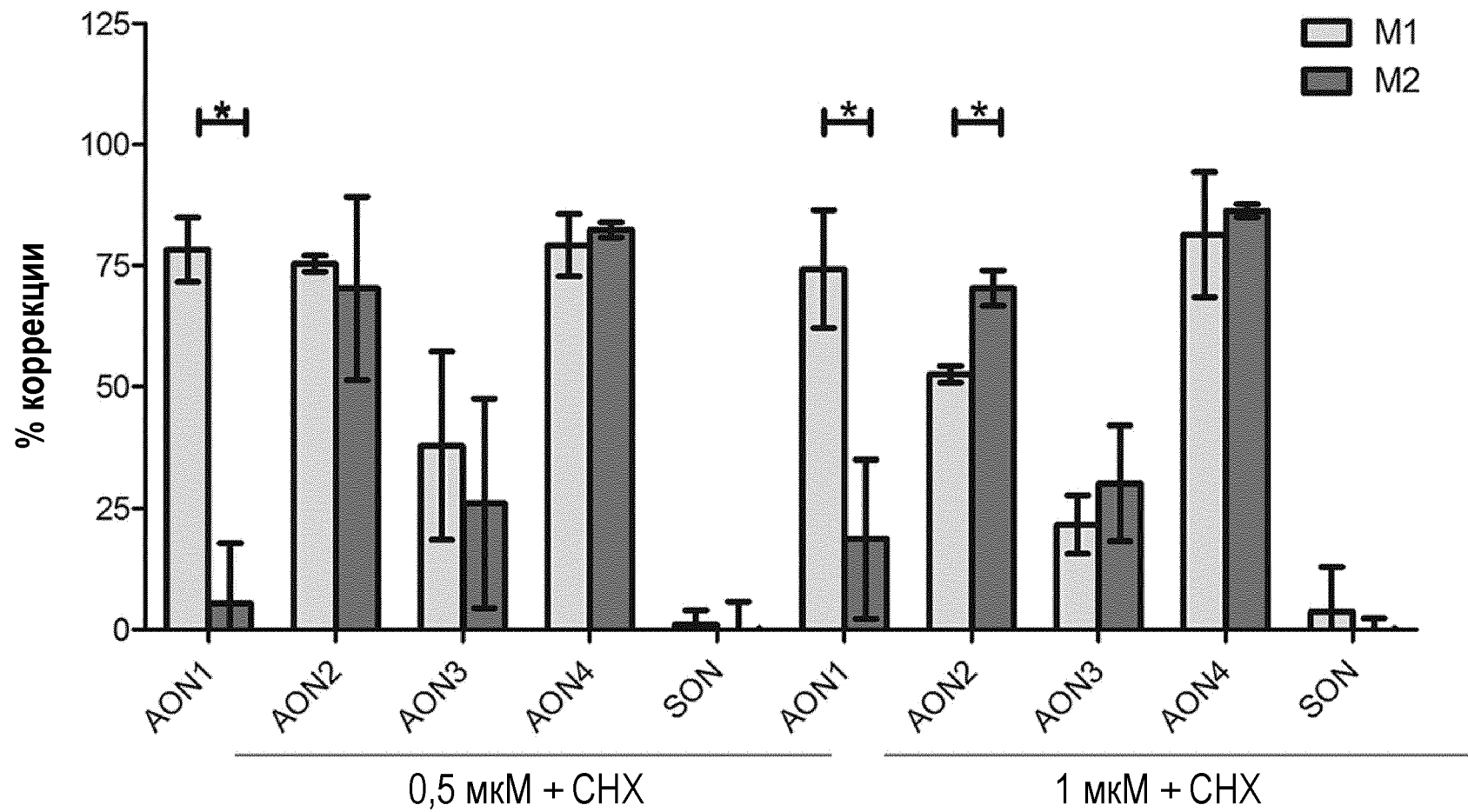


ФИГ.6С

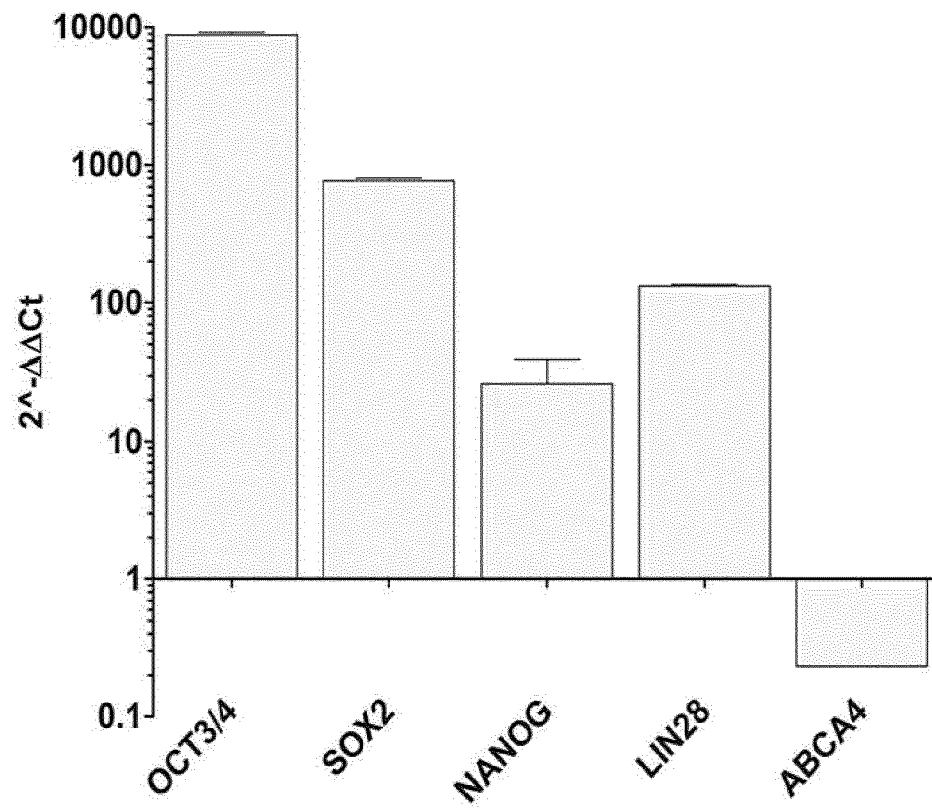




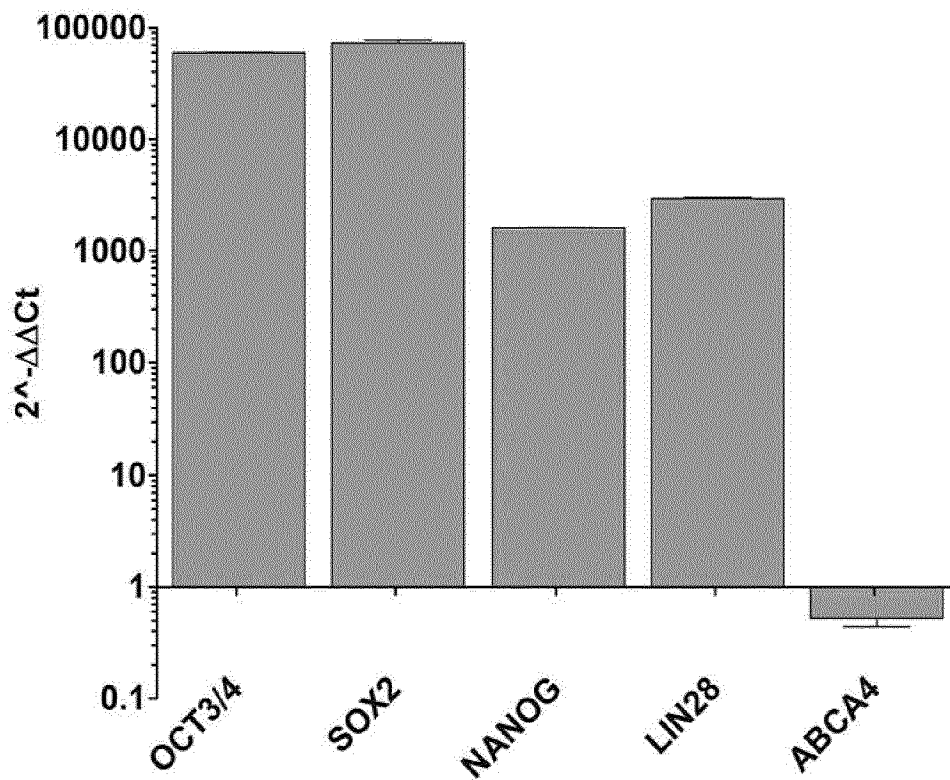
ФИГ.6D



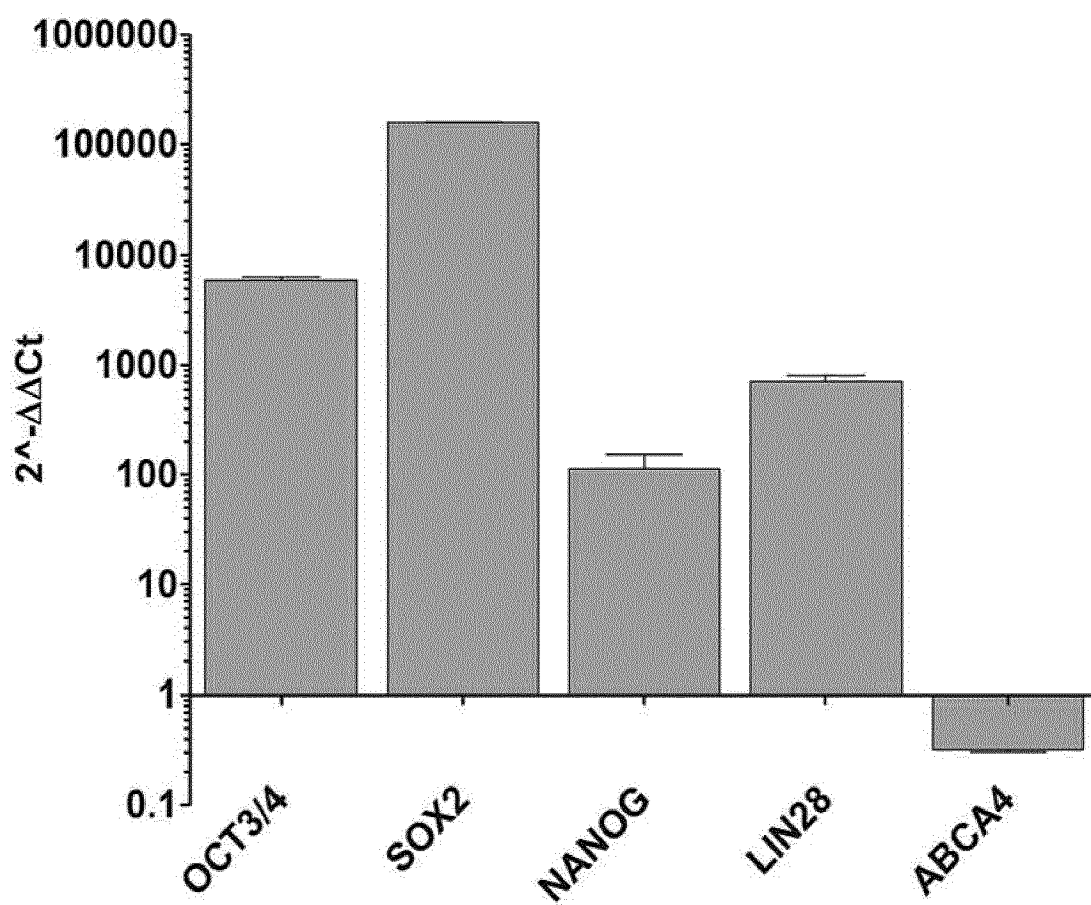
ФИГ.7А1



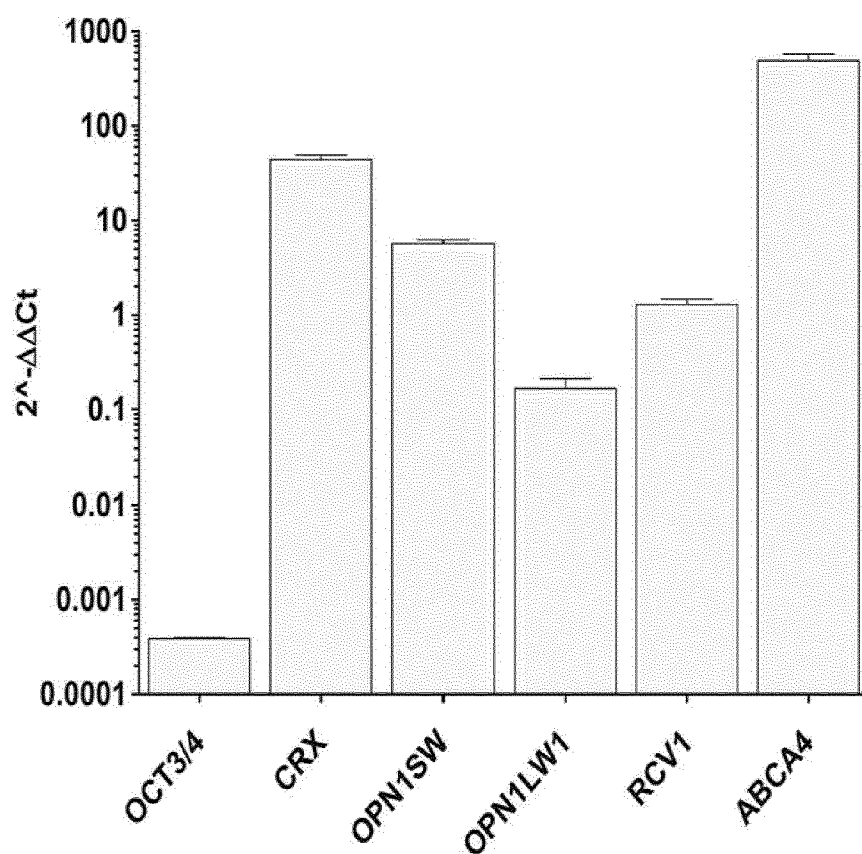
ФИГ.7А2



ФИГ.7А3

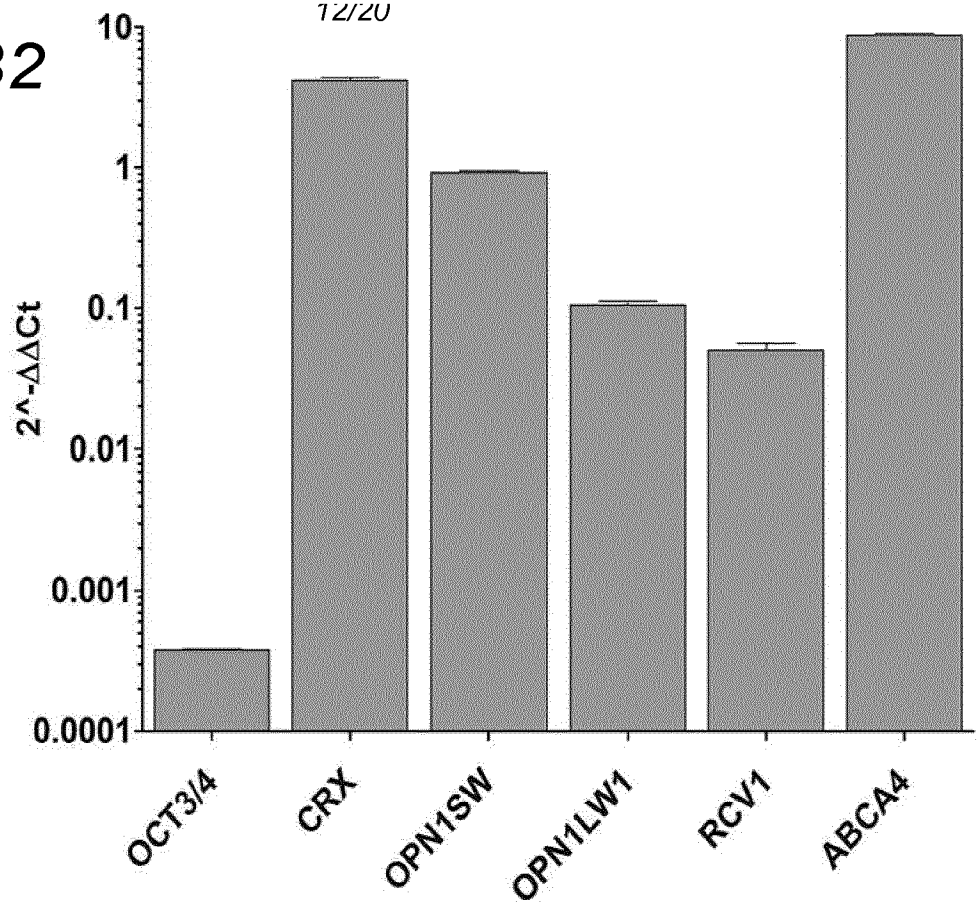


ФИГ.7В1

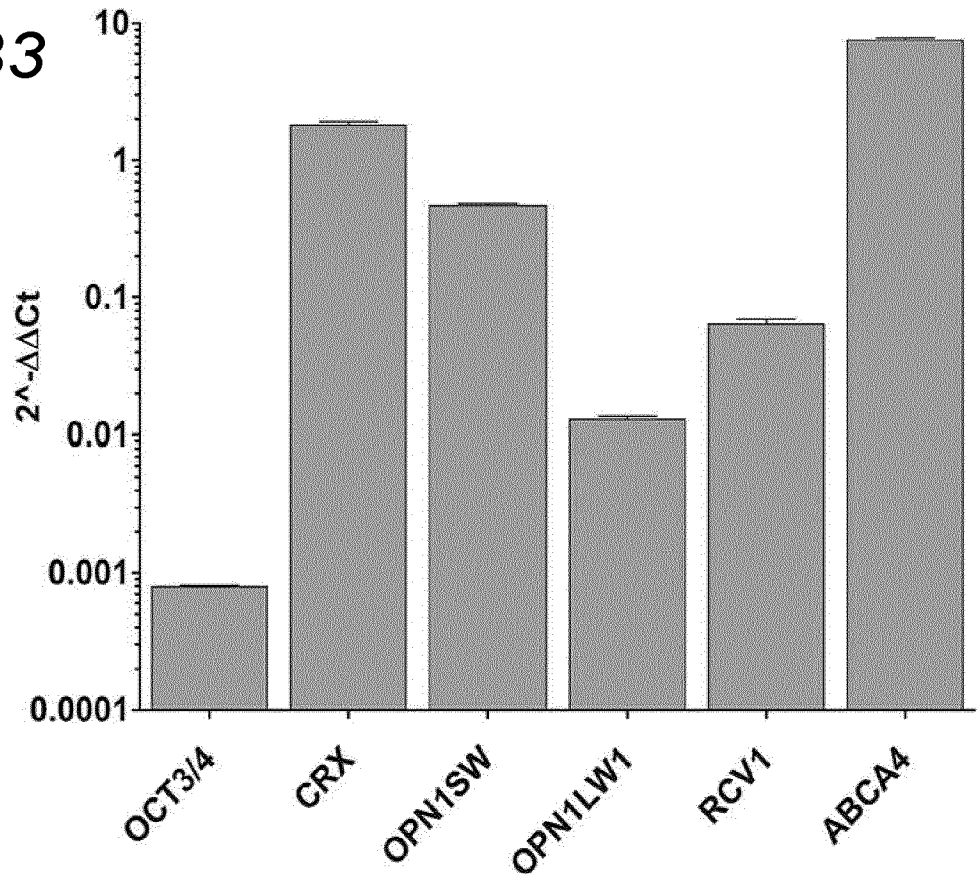


12/20

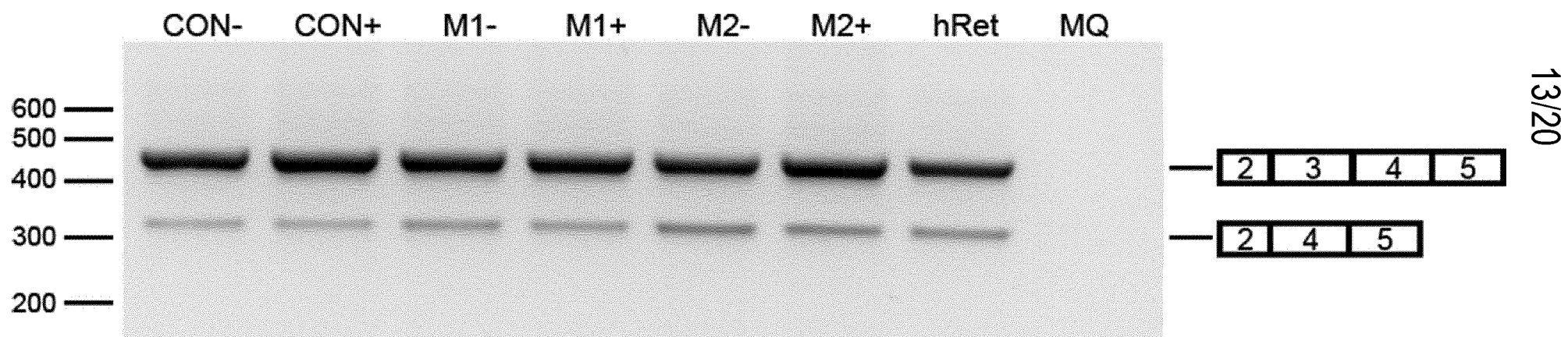
ФИГ.7В2



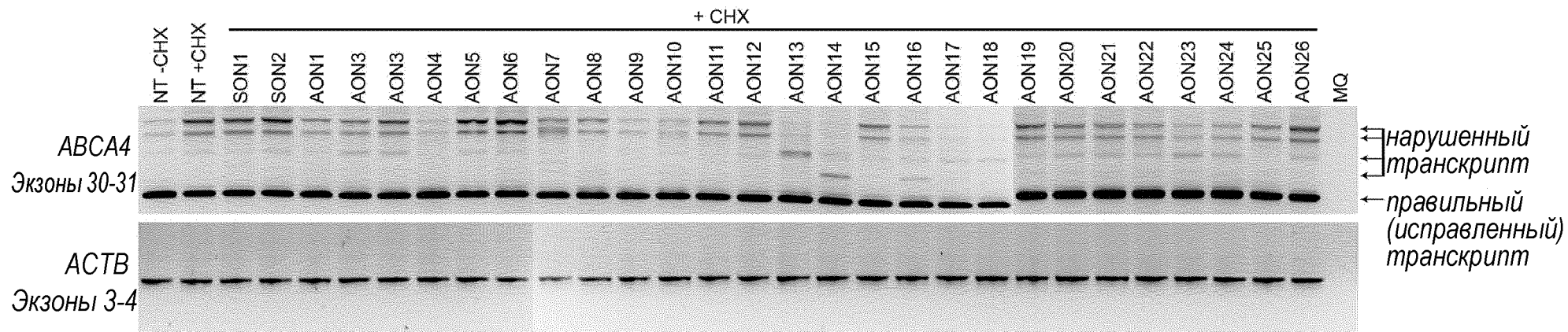
ФИГ.7В3



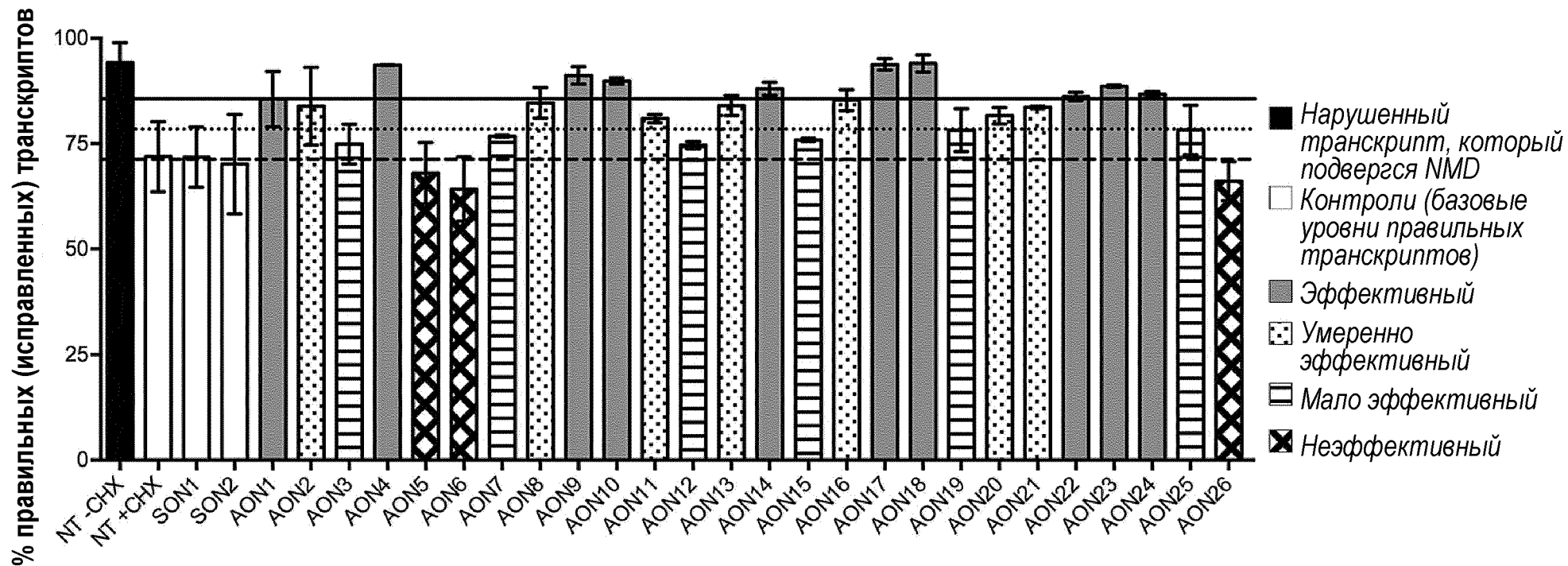
ФИГ.8



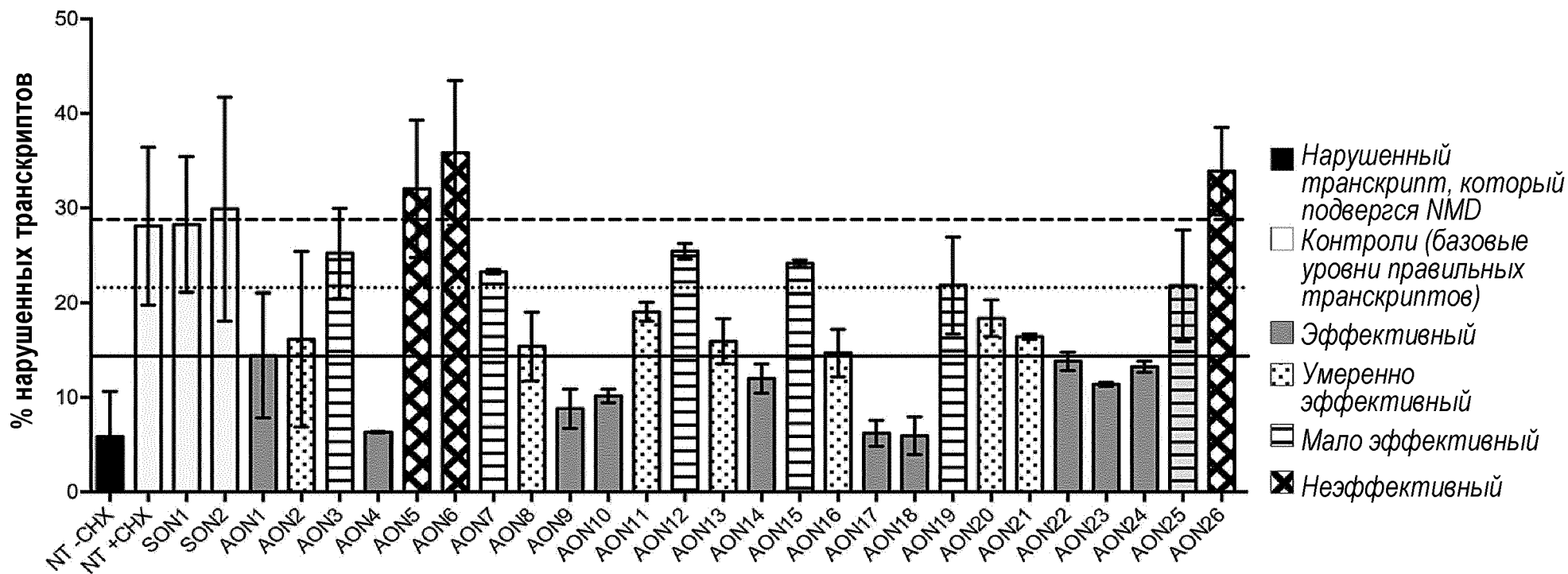
ФИГ.9А



ФИГ.9В



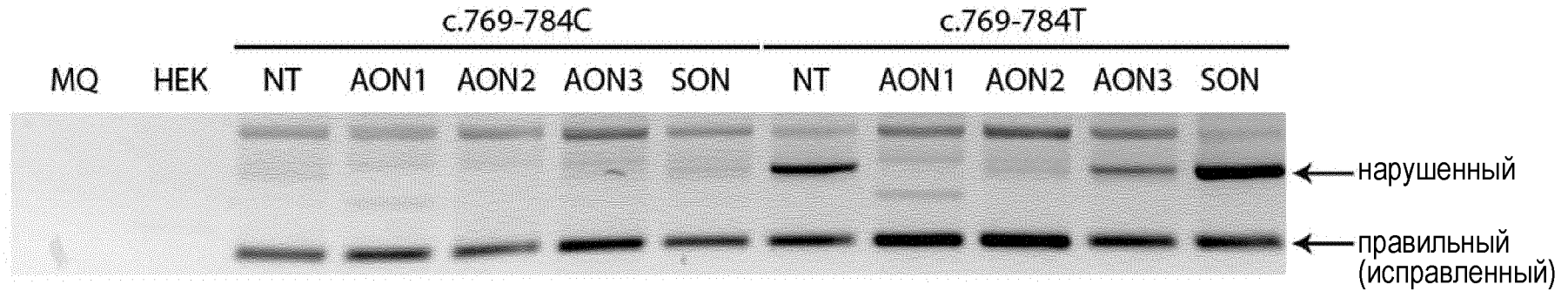
ФИГ.9С





ФИГ.10А

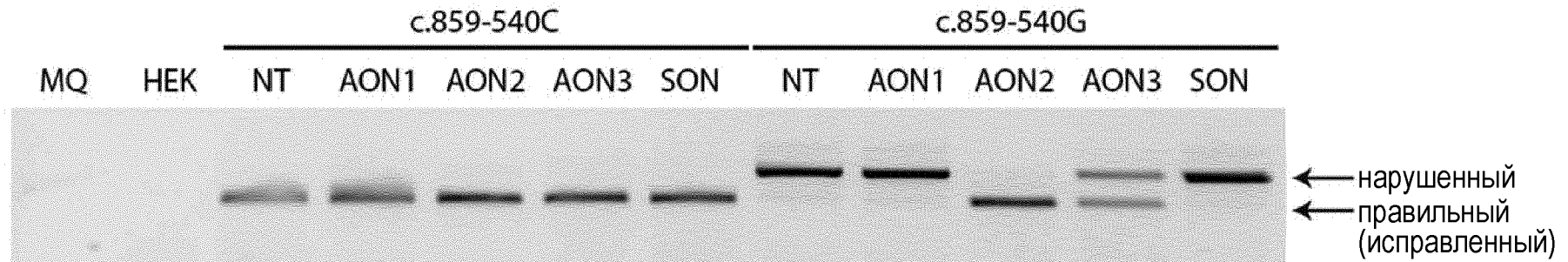
**c.769-784C>T**



17/20

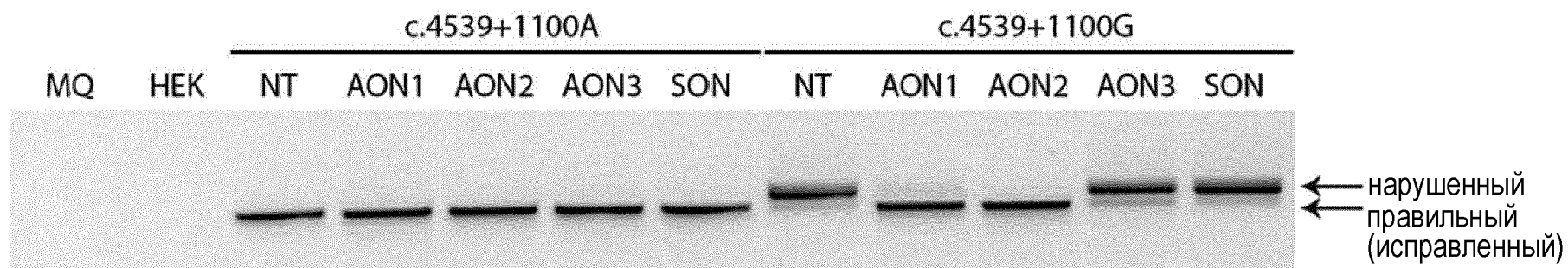
ФИГ.10В

**c.859-540C>G**



ФИГ.10С

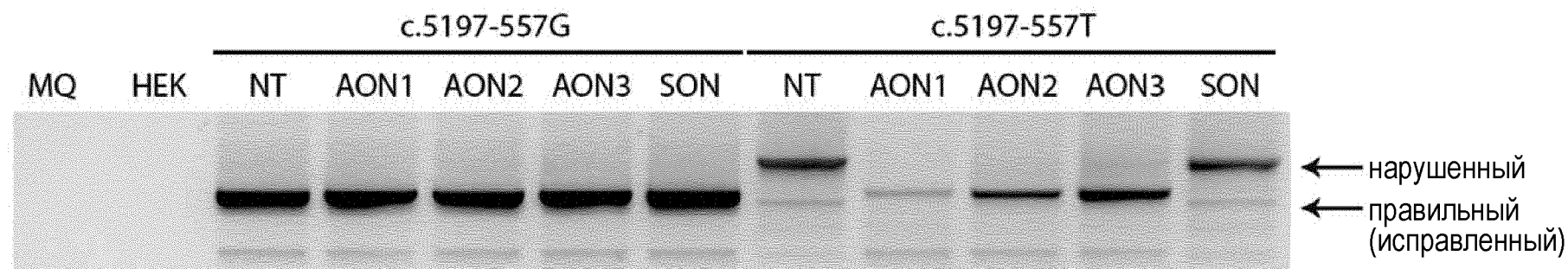
### c.4539+1100A>G



18/20

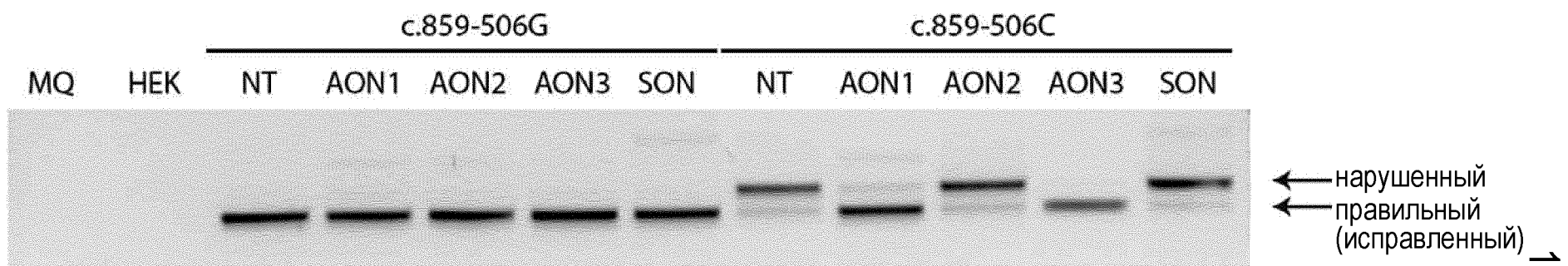
ФИГ.10D

### c.5197-557G>T



ФИГ.10Е

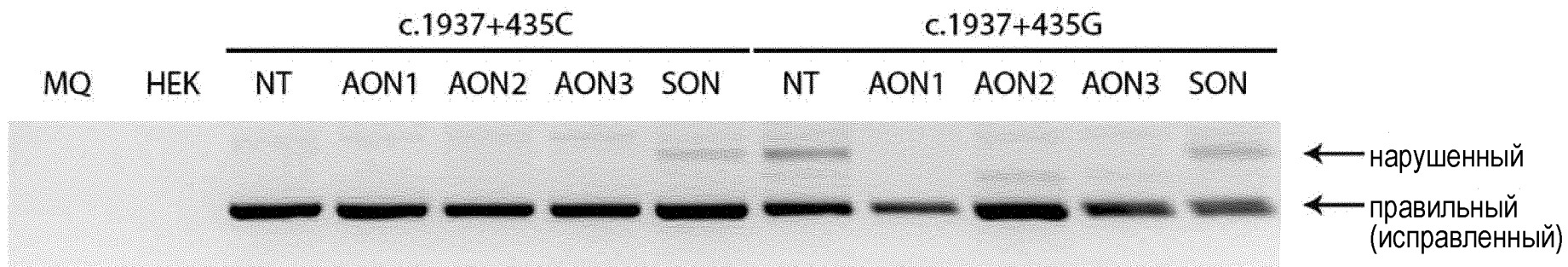
**c.859-506G>C**



19/20

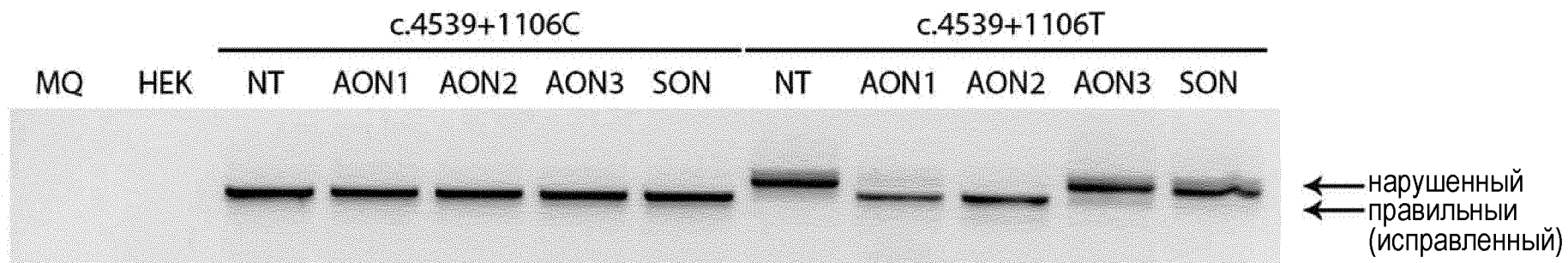
ФИГ.10F

**c.1937+435C>G**



ФИГ.10G

**c.4539+1106C>T**



20/20

**ОТЧЕТ О ПАТЕНТНОМ ПОИСКЕ**

(статья 15(3) ЕАПК и правило 42 Патентной инструкции к ЕАПК)

Номер евразийской заявки:

**202390939**А. КЛАССИФИКАЦИЯ ПРЕДМЕТА ИЗОБРЕТЕНИЯ:  
См. дополнительный лист

Б. ОБЛАСТЬ ПОИСКА:

C12N 15/113, A61K31/712, A61K31/7125, A61P27/02

Электронная база данных, использовавшаяся при поиске (название базы и, если возможно, используемые поисковые термины)  
Espacenet, EAPATIS, Google, Lens, BLAST, PubMed, Patentscope, USPTO, SIPO, Embase, PAJ

В. ДОКУМЕНТЫ, СЧИТАЮЩИЕСЯ РЕЛЕВАНТНЫМИ

Категория*	Ссылки на документы с указанием, где это возможно, релевантных частей	Относится к пункту №
X	US 20150232836 A1 (KRIEG et al.), 2015-08-20 SEQ ID NO:949850, абзацы: [0009]-[0010], [0025], [0228]-[0232], [0203], [0216]	1, 2, 4, 6, 9-11
Y		8, 12-15
Y	WO 2016034680 A1 (STICHTING KATHOLIEKE UNIVERSITEIT) 2016-03-10 реферат, формула	8, 12-15
A	WO 2015004133 A1 (INSERM (INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE) И ДР.) 2015-01-15 пример 2, стр.20, формула	1-2, 4-15
A	ALBERT S et al., "ABCA4 mRNA analysis of iPSC-derived photoreceptor cells of Stargardt patients reveals protein-truncating non-canonical and deep-intronic splice site variants", HUMAN GENE THERAPY, 2016-11, vol. 27, no.11, pp.A1-A185, A119, P243 & "Changing the Face of Modern Medicine: Stem Cells and Gene Therapy", Florence, Italy, October 18-21, 2016 Abstracts реферат	1-2, 4-15

 последующие документы указаны в продолжении графы

\* Особые категории ссылочных документов:

«А» - документ, определяющий общий уровень техники

«D» - документ, приведенный в евразийской заявке

«E» - более ранний документ, но опубликованный на дату подачи евразийской заявки или после нее

«O» - документ, относящийся к устному раскрытию, экспонированию и т.д.

"P" - документ, опубликованный до даты подачи евразийской заявки, но после даты испрашиваемого приоритета"

«Т» - более поздний документ, опубликованный после даты приоритета и приведенный для понимания изобретения

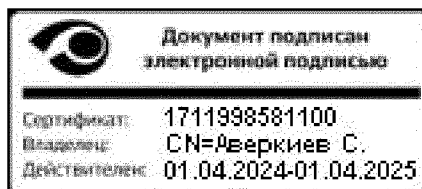
«X» - документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий новизну или изобретательский уровень, взятый в отдельности

«Y» - документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий изобретательский уровень в сочетании с другими документами той же категории

«&amp;» - документ, являющийся патентом-аналогом

«L» - документ, приведенный в других целях

Дата проведения патентного поиска: 07 мая 2024 (07.05.2024)

Уполномоченное лицо:  
Начальник Управления экспертизы

С.Е. Аверкиев

**ОТЧЕТ О ПАТЕНТНОМ ПОИСКЕ**  
**(дополнительный лист)**

Номер евразийской заявки:

**202390939**

КЛАССИФИКАЦИЯ ПРЕДМЕТА ИЗОБРЕТЕНИЯ (продолжение графы А)

МПК:

*C12N 15/113* (2010.01)  
*A61K31/712* (2006.01)  
*A61K31/7125* (2006.01)  
*A61P27/02* (2006.01)

СПК:

**C12N15/113**  
**A61P 27/02**  
C12N 2310/11  
C12N 2310/315  
C12N2310/321  
C12N 2310/346  
C12N 2320/33

**ОТЧЕТ О ПАТЕНТНОМ ПОИСКЕ**  
(дополнительный лист)

Номер евразийской заявки:

**202390939**

**Раздел I. ЗАМЕЧАНИЯ ДЛЯ СЛУЧАЯ, КОГДА НЕКОТОРЫЕ ПУНКТЫ ФОРМУЛЫ ИЗОБРЕТЕНИЯ НЕ ПОДЛЕЖАТ ПОИСКУ**

Настоящий отчет о патентном поиске не охватывает некоторые пункты формулы изобретения по следующим причинам:

1.  пункты формулы изобретения №:  
т.к. они относятся к объектам, указанным в правиле 3(3) Патентной инструкции к ЕАПК, а именно:
  
  
  
  
  
  
  
  
  
  
2.  пункты формулы изобретения №:  
т.к. они относятся к части евразийской заявки, которая не отвечает установленным требованиям в такой степени, что по ней невозможно провести полноценный патентный поиск, а именно:

**Раздел II. ЗАМЕЧАНИЯ ДЛЯ СЛУЧАЯ НЕСОБЛЮДЕНИЯ ЕДИНСТВА ИЗОБРЕТЕНИЯ**

Единство изобретения не соблюдено по следующим причинам:

Поскольку АОН по п.3 перенаправляет сплайсинг АВСА4 в псевдоэктоне 10 или 30, тогда как остальные изобретения перенаправляют сплайсинг АВСА4 в псевдоэктоне 6-7, то п.3 образует отдельную группу изобретений несвязанную с остальными единством (в смысле требований п.4 Инструкции).